

## SOD2欠損による酸化ストレスが与えるゲノム安定性、細胞周期進行への影響

著者	伊田 隼也
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/35198">http://hdl.handle.net/10097/35198</a>

## 修士論文

# SOD2 欠損による酸化ストレスが与える ゲノム安定性、細胞周期進行への影響

東北大学大学院薬学研究科 博士課程前期

生命薬学専攻 遺伝子薬学分野

A6YM1073 高田 隼也

# 目次

第1章 要旨	2
第2章 緒言	5
第1節 はじめに	5
第2節 ROS (活性酸素種)の発生と除去	6
第3節 ROS と細胞増殖	7
第4節 ROS とゲノム安定性	10
第5節 SOD2	10
第6節 ニワトリ DT40 細胞	12
第7節 本研究の目的	12
第3章 ニワトリ DT40 細胞を用いた <i>SOD2</i> 条件破壊株の作成	13
第4章 ニワトリ DT40 細胞を用いた <i>SOD2</i> 条件破壊株の表現型解析	21
第5章 考察	38
第6章 実験材料および方法	43
謝辞	71
引用文献	72

## 第1章 要旨

**【背景と目的】** スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase : SOD) はスーパーオキシドを過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) に変換する酵素であり、この SOD によって、生体内はスーパーオキシドのレベルが低く保たれている。SOD は高等真核生物では、細胞質局在型の SOD1、ミトコンドリア局在型の SOD2、分泌型の SOD3 の3種類の存在が知られている。

一方、出芽酵母ではこの SOD とゲノム安定性に関与する遺伝子群との二重破壊株が合成致死になるなど、SOD のゲノム安定性への関与が示唆されている。また、ミトコンドリア局在型の SOD である SOD2 は細胞周期依存的に発現量が増減することが知られており、細胞周期の進行に何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

しかしながら、これら抗酸化酵素のノックアウトマウスは作成されているものの、それ由来の細胞はすでに過度な酸化ストレスに長期間にわたり受けているために、正確に抗酸化酵素のゲノム安定性、および細胞周期の進行への寄与を解析できている報告はない。そこで、本研究では、容易に遺伝子破壊が行えるニワトリ DT40 細胞を用いて、抗酸化酵素の条件破壊株を作成し、遺伝学的解析を行うことにした。特に、本研究では SOD2 に着目して解析を行った。

### 【結果と考察】

#### 1) SOD2 の発現停止後、過度の酸化ストレスによって徐々に表現型が悪化する。

DT40 細胞に、Tet-off system を導入した SOD2 条件破壊株を作製し、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリンを添加したところ、Tet-off system で発現させた human SOD2 は約2日では検出限界以下まで発現量が低下した。また、このときの細胞増殖能および、メチルセルロース培地でのコロニー形成率を測定した結果、SOD2 の発現がほぼ停止するドキシサイクリン添加後2日目の細胞では、細胞増殖能及びコロニー形成率にそれほど顕著な低下は観察されなかったが、4日から5日で顕著に低下した。さらに、スーパーオキシドを細胞内で発生させるパラ

コートに対する感受性を、PI 染色によるフローサイトメトリーによって観察したところ、やはりドキシサイクリン添加によって経時的に感受性が上昇していくことがわかった。以上のことから、SOD2 の発現停止後、内在性のスーパーオキシドの増加によって過度の酸化ストレスが発生し、SOD2 枯渇細胞の増殖能が低下していくことが示唆された。

## 2) SOD2 枯渇によりゲノムに DNA 傷害を起こさない。

SOD2 枯渇条件下で、methyl methanesulphonate や 4-nitroquinolin-1-oxide などの DNA 傷害剤に対する感受性を測定したところ、顕著な感受性を観察することはできなかった。さらに、DNA 傷害の存在の指標として、姉妹染色分体交換(SCE)を測定したところ、野生株との差は認められなかった。SCE 上昇は最も鋭敏なゲノム傷害の指標であることから、SOD2 が枯渇しても、直接ゲノムに DNA 傷害が起こるわけではないことが示唆された。

また、DNA 複製阻害剤である hydroxy urea や aphidicoline に対する感受性を観察したところ、これらの薬剤に対して耐性を示すことが明らかとなった。

## 3) SOD2 の発現停止は、G<sub>1</sub> から S 期への移行および S 期の進行を遅延させる。

SOD2 枯渇による細胞増殖能の低下の原因を探るため、細胞周期分布の変化を観察したところ、G<sub>1</sub> 期の細胞群の割合が若干増加し、S 期の細胞群の割合が低下していた。更に G<sub>1</sub> 期および G<sub>2</sub>/M 期に細胞を同調し、次に、同調を解除して細胞周期を進行させたところ、G<sub>1</sub> 期から S 期への移行、S 期の進行に遅延が観察された。

### 【考察】

SOD2 の発現を停止させても、DNA 傷害剤に対する感受性が野生株と同程度だったことから、抗酸化酵素がゲノム安定性に直接関与することを示唆する証拠は得られなかった。しかしながら、SOD2 枯渇によって、細胞増殖能が低下し、その原因は、主に G<sub>1</sub> 期から S 期の移行および S 期の進行にあることが明らかとなった。SOD2 を過剰発現させた細胞は G<sub>1</sub> 期から S 期の移行能が

高まることが報告されており、本研究の結果はこの報告と矛盾しない。更に、SOD2 枯渇細胞は DNA 複製阻害剤である HU や aphidicoline に対して耐性を示したこと、DNA 複製速度の遅延はほとんど観察されなかったこと、DNA 複製 check point 機構に關与する CHK-1 の活性化が観察されなかったことから、SOD2 欠損によって生じる酸化ストレスが DNA 複製の開始を遅延する可能性が示唆された。

## 第2章 緒言

### 第1節 はじめに

活性酸素種 (ROS) は酸素が生体内のエネルギー産生等の過程で産生され、酸素に比べ、より反応性の高い分子群である。主に ROS はミトコンドリアの電子伝達系など代謝の過程において発生するが、抗酸化酵素や抗酸化物質によって除去され、生体内における存在量は常に制御されている。しかしながら、放射線や紫外線の暴露、加齢などによる過剰な ROS の発生や、除去能の低下は生体内において酸化ストレスを誘発する。

一方、抗酸化酵素の変異は様々な疾患を引き起こすことが知られている。スーパーオキシドジスムターゼの1種である SOD1 の点変異が筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者の数%に観察されることが報告されている(Rosen *et al.*, 1993)。また、第21番染色体のトリソミーによって起こるダウン症候群では SOD1 の活性が増加することが知られており、神経疾患の一部の発症に抗酸化酵素が関与していると考えられる(Avraham *et al.* 1988)。その他に、SOD2 の mitochondria targeting sequence にあたる、9番目のアラニンのバリンへの置換変異によって、運動神経疾患や特発性心筋症の発症リスクが高まること(Hiroi *et al.*, 1999)、フィンランド人で乳癌発生率が1.5倍程度まで高まることが知られている(Mitune *et al.*, 2001)。また、同変異が早老症患者の一部に認められており、当研究室で研究が進められているウェルナー症候群や、核膜の裏打ちタンパク質であるラミン A の変異が原因であるプロジェリア、色素性乾皮症の G 群やコケイン症候群といった早老症患者にもこの変異が一部認められることが報告されている(Rosenblum *et al.*, 1996)。

さらに、これらの臨床上の報告に加え近年、出芽酵母において抗酸化酵素とゲノム安定性維持や細胞周期の進行に関与する遺伝子との二重破壊株が合成致死になることが分かってきている(Tong *et al.*, 2001、Huang *et al.*, 2003、Pan *et al.*, 2006)。以上のことから、抗酸化酵素はゲノ

ム安定性維持や細胞周期の進行に何らかの役割を担っている可能性が高い。また、これら抗酸化酵素のノックアウトマウスは作成されているものの、それ由来の細胞はすでに過度な酸化ストレスに長期間にわたり受けているために、抗酸化酵素のゲノム安定性、および細胞周期の進行への寄与を正確に解析できていない状況にある。そこで本研究では、遺伝子破壊が可能でしかも、条件破壊株が作製可能なニワトリ B 細胞由来の DT40 細胞の抗酸化酵素条件破壊株を作製し、解析を行うことにした。

## 第2節 ROS(活性酸素種)の発生と除去

活性酸素種 (ROS) とは、スーパーオキシド( $O_2^-$ )、過酸化水素( $H_2O_2$ )、一重項酸素( $O^1$ )など、酸素が生体内のエネルギー産生等の過程で、より反応性の高い分子種に変化したものである。主な発生源として、ミトコンドリアの電子伝達系その他、炎症や、放射線、紫外線に暴露した箇所がある。その他、好中球やマクロファージといった食細胞には、NADPH オキシダーゼによって自発的に ROS を発生させて殺菌する機構が存在する。

ROS は反応性が高く、過剰量存在すれば生体内で DNA やタンパク質、脂質などを傷害することが知られている。その結果、細胞レベルでは細胞老化や、癌化、アポトーシスによる細胞死などを引き起こし、個体レベルでは糖尿病や動脈硬化、消化器疾患の原因になることが報告されている。そのため、過剰な ROS を除去し一定のレベルに保つ機構が必要である。そのひとつは、抗酸化酵素によるもので、スーパーオキシドを過酸化水素に変換するスーパーオキシドジスムターゼ(SOD) や、過酸化水素を水に変換するカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼや、ペルオキシレドキシンなどの存在が知られている。もうひとつは、抗酸化物質によるもので、ビタミン A、E、グルタチオン、チオレドキシンなどが関与している。



### 第3節 ROS と抗酸化酵素とゲノム安定性

第1節で述べたように、ROSはDNAの傷害に関与していると考えられている。しかしながら、スーパーオキシドや過酸化水素のような代表的なROSはDNAを単独で傷害するような傷害性を有してはおらず、より反応性の高い、ヒドロキシラジカル( $\text{HO}\cdot$ )やペルオキシナイトライト( $\text{ONOO}\cdot$ )などがDNA傷害の原因になっていると考えられる。これらは、反応性の比較的低いROSが細胞内の分子との反応で生成する。それぞれ、ヒドロキシラジカルは過酸化水素が鉄や銅イオン、クロムなどの金属イオンと反応することで発生し、ペルオキシナイトライトはスーパーオキシドと一酸化窒素が反応することで発生する。これらのDNA傷害作用は強力で、8-ヒドロキシグアニンの生成など、各種塩基の傷害や、DNA二本鎖切断、DNA一本鎖切断など多様なDNA傷害を誘発する。

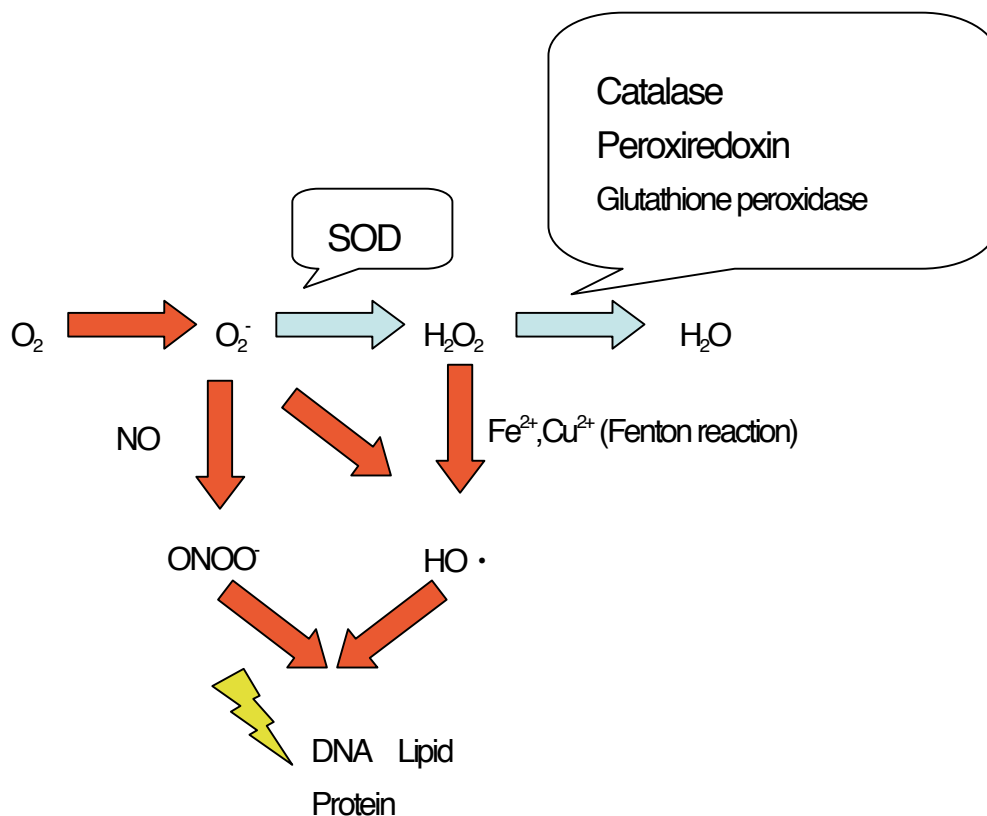


Fig2-1 ROS と抗酸化酵素の関係図

一方で近年になり、出芽酵母を用いた大規模スクリーニングが行われ、細胞質局在型のSODをコードする *SOD1* あるいは *TSA1*(ペルオキシレドキシン2、4の出芽酵母ホモログ)とゲノム安定性維持に関与している遺伝子群との二重破壊株が合成致死になることが示された。Table 2-1 に合成致死となった遺伝子名を示す。

	<i>SOD1</i>	<i>SOD2</i>	<i>TSA1</i>
DNA replication	<i>POL30, POL32</i>  <i>SGS1, RAD27</i>	<i>RRM3</i>	<i>POL32, SGS1,</i>  <i>TOP3, RMI1</i>  <i>HUR1, RAD27</i>
DNA repair	<i>RAD51, RAD52,</i>  <i>RAD54, MRE11,</i>  <i>RAD5, RAD18,</i>  <i>RTT107, MMS1</i>		<i>OGG1, RAD51,</i>  <i>RAD52, MSH2,</i>  <i>RAD18, MUS81,</i>  <i>RTT107, MMS4</i>
Checkpoint	<i>RAD24, RAD17,</i>  <i>RAD9, MEC3,</i>  <i>TOF1, DDC1</i>		<i>RAD24, RAD17,</i>  <i>CHK1, DUN1,</i>  <i>MEC3, DCC1</i>
Sister chromatid segregation	<i>SGO1, KAR3,</i>		
Chromatin remodeling factor	<i>HDA1, HIR3,</i>		<i>ASF1, RTT109</i>
Histone chaperon etc...	<i>SWR1, ARP8</i>		

**Table. 2-1** 出芽酵母において抗酸化酵素と合成致死となる遺伝子群

また、*sod1* 破壊株は Methyl methanesulphonate (MMS) や 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO) といった DNA 傷害剤や DNA 合成阻害剤である、Hydroxyurea (HU) に対して非常に強い感受性を示し、その原因は、DNA 合成の律速酵素である Ribonucleotide reductase の還元に必要な NADPH が枯渇してしまったこと、また、DNA 傷害チェックポイントの活性化が減弱化してしまうためであることが報告されている (Carter *et al.*, 2005)。また、*tsal* 破壊株は DNA 傷害剤に対する感受性が野生株と同程度であるものの、非常に高頻度で DNA に変異が生じることが報告されている (Huang *et al.*, 2005、Ragu *et al.*, 2007)。抗酸化酵素破壊株で生じた表現型から、抗酸化酵素は ROS の除去のみならず、代謝やゲノム安定性維持機構自体に関与して、ゲノム安定性維持に関与している可能性は高い。一方、これらの報告とは別に、DNA 傷害チェックポイントにおいて機能し毛細血管拡張性失調症 (ataxia telangiectasia ; AT) の原因遺伝子産物である ATM や DNA 二本鎖切断の修復機構のひとつである、Non-homologous End Joining (NHEJ) に関与する KU86 のノックアウトマウスに SOD1 を過剰発現すると致死となることが報告されている (Peter *et al.*, 2001、Karanjawala *et al.*, 2002、Karanjawala *et al.*, 2003)。SOD はスーパーオキシドを除去すると同時に、過酸化水素を生成しているために、過剰に存在してもゲノム安定性を低下させることがこの結果より示され、抗酸化酵素活性の調節の重要性が示唆されている。

#### 第4節 ROS と細胞増殖

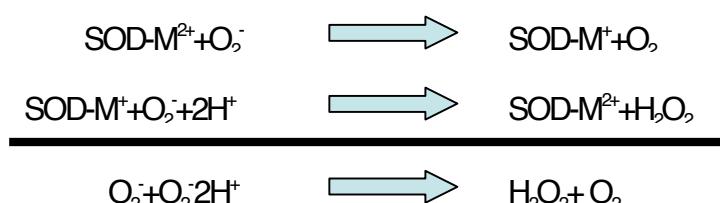
ROS はDNA やタンパク質、脂質などに対して高い傷害性を有するために、有害物質として捉えられる一方で、シグナル伝達物質として機能し、タンパク質中のチオール基を酸化、立体構造を変化させることで、タンパク質の酵素活性、細胞内局在、DNA 結合性等を変化させることが知られている。

ROS はシグナル伝達物質として、細胞増殖や細胞周期の進行にも関与している可能性が示唆されており、細胞増殖に関与する経路やS 期(DNA 複製期) やM 期(分裂期) の開始を制御している因子の活性化、不活化への関与を報告している論文は多数存在している。細胞増殖因子としては、epidermal growth factor (EGF) やplatelet-derived growth factor (PDGF) 、protein Kinase C (PKC) やprotein kinase B (AKT) の経路がROS を介して活性化、不活化されることが報告されている(Bae *et al.*, 1997、Brar *et al.*, 1999、Junn *et al.*, 2000、Sundaresan *et al.*, 1995)。また、細胞周期の進行に関与している因子としては、cyclin D1 やp16、p21、Cdc25c が報告されている。

#### 第5節 SOD2

SOD はスーパーオキシドを過酸化水素に変換する抗酸化酵素の1 つであり、原核生物では鉄イオン配位型のFe-SOD やニッケルイオン配位型のNi-SOD が、出芽酵母など下等真核生物では銅イオンおよび亜鉛イオン配位型のCu, Zn-SOD (SOD1)、マンガンイオン配位型のMn-SOD (SOD2) の2種類が存在し、更に高等真核生物では分泌型のEC-SOD (SOD3) が存在していることが知られている。このうち、SOD2 はFe-SOD との間で相同性を有している。SOD2 は224 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端側にミトコンドリア移行シグナルが存在し、4 量体としてミトコンドリアに存在している。Fig.2.2 に示すような活性を持ち、活性の発現には活性中心である Tyr 34 の他、マンガンイオンが必要であるため、マンガンイオンの結合部位である、

His 26、His 81、Asp 167、Asp 171 が重要なアミノ酸残基として保存されている。



**Fig. 2-2 SOD の酵素活性**

*Sod2* のノックアウトマウスはすでにふたつの系統において作製されており、どちらの系統においても平均的な寿命は2週間程度で、心筋等が傷害され致死となることが報告されている。さらに、このノックアウトマウス由来細胞は染色体異常が起きていることが報告されており、*Sod2* がゲノム安定性に寄与している可能性が示唆されている。

出芽酵母では、5' → 3' 方向のDNA helicase 活性を持つタンパク質であり、真核生物において高く保存されている Pif1 の subfamily である *RRM3*(rDNA recombination mutation) と *SOD2* の二重破壊株が合成致死になることが報告されている。その他、*Sod2* と物理的に相互作用するタンパク質として、Non-homologous End Joining (NHEJ) に関与する Yku80 や、single-stranded DNA endonuclease である Rad10 がプロテオミクスの手法により同定されている(Ho *et al.* 2002)。

また、*SOD2* は、細胞周期依存的に活性が変動することが知られており、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期において活性が最も高く、S 期に入ったと同時に急激に低下し、同時に ROS も増加することが報告されている(Oberley *et al.* 1995)。さらに、*SOD2* を HeLa 細胞で過剰発現させるとコンフルエントになり、通常なら G<sub>1</sub> 期に停止する条件になっても、更に細胞増殖能を保つことができることが報告されている(Sarsour *et al.*, 2005)。

## 第6節 ニワトリ DT40 細胞

DT40 細胞株は、ニワトリ B リンパ球由来の細胞であり、ニワトリの免疫担当器官であるブルザ内の細胞をトリ白血病ウィルスで不死化させ、ニワトリ B リンパ球前駆細胞の分裂の際に行われる V-J 断片と偽 V 断片間の相同組換えの結果生じる lg gene conversion の能力の保持を指標として単離された細胞である。この細胞では、標的組換えがランダムインテグレーションと同じ効率で起こることが報告された (Buerstedde and Takeda, 1991)。そのため、DT40 細胞株は特定遺伝子の破壊株が容易に作製でき、迅速な遺伝学的解析が可能となる。さらなる利点としては、(1) 7 種類の薬剤耐性マーカーが使えるので最大 3 種類の遺伝子の重複ノックアウトができること、(2) 核型と細胞の表現型が非常に安定であり、また、細胞の増殖が速いこと、(3) 致死的変異の導入の際にはテトラサイクリンを用いた on-off の系を導入する Tet-on/Tet-off gene expression system や Cre-LoxP system のような条件致死株を作製することができるが挙げられる。

## 第7節 本研究の目的

*Sod2* のノックアウトマウスは寿命が最長 2、3 週間と大変短命であり、かつ解析時にはすでに長期間に渡って酸化ストレスを受け続けている状態にあるため、SOD2 本来の機能を評価するのは困難である。そこで本研究では、ニワトリ DT40 細胞の長所を活かし、テトラサイクリンを用いた on-off の系を導入する Tet-on/Tet-off gene expression system を用いることで、SOD2 発現停止直後の表現型を解析することを可能とする系を確立し、SOD2 枯渇直後の酸化ストレスがゲノム安定性や細胞周期進行に与える影響を解析することを目的とした。

### 第3章 ニワトリ DT40 細胞を用いた *SOD2* 条件破壊株の作製

#### 第1節 はじめに

前章で述べたように、ミトコンドリア局在型SODである*SOD2*のゲノム安定性の維持や細胞周期の進行への関与を解析するために、DT40 *SOD2* 破壊株を作製するにあたって問題となると考えられたのが、他種の*SOD2* 破壊株で観察される致死性である。*SOD2*のノックアウトマウスは胎生致死にならないまでも、心筋等の傷害から寿命は最長でも2週間程度であること、またノックアウトマウス由来細胞も非常に表現型が強く、神経由来細胞は通常培養条件下では致死である(Li *et al.*, 1995、Liu *et al.*, 2006)。このため、通常の方法で*SOD2* 遺伝子を破壊しても、*SOD2* 破壊株が得られない可能性が高かった。また、仮に樹立可能だったとしても、過度な酸化ストレスが蓄積していき、徐々に劣化していく可能性が考えられるため、*SOD2*のゲノム安定性維持や細胞周期の進行への関与を正確に追求するのは困難であると考えられた。そこで、テトラサイクリン誘導体である、ドキシサイクリンの添加によって目的のタンパク質の発現を停止させることができる Tet-off system を導入し、*SOD2* 条件破壊株を作製することにした。

そこで、*SOD2* 条件破壊株樹立の戦略を以下のように立てた。

- ① *SOD2* 破壊用ベクターを作製する
- ② *SOD2*<sup>-/-</sup>株を作製する。
- ③ Tet-off system でヒト*SOD2*を発現させるためのベクター(h*SOD2*/1-118)を作製し、*SOD2*<sup>-/-</sup>株に導入する。
- ④ *SOD2*<sup>-/-</sup>/h*SOD2*-HA<sup>tet-off</sup>株を作製する。

## 第2節 *SOD2* 破壊用ベクターの作製

### 3.2.1 ニワトリ *SOD2* のゲノムDNAのクローニング

まず、ニワトリ *SOD2* 破壊用ベクターを作製するために、DT40 細胞からゲノムDNAを抽出し、これを鋳型として *SOD2* のゲノムDNA 全長をPCRによって増幅しようと試みた。しかし、GC rich な配列が第一エクソンからイントロンにかけて数百塩基存在するためか、PCR産物をアガロース電気泳動によって展開しても、数回に1回程度しか目的の大きさのバンド (約7 Kbp) を確認することはできず、しかも確認できたとしても、増幅効率が極めて悪かった。そこで、このPCR産物を鋳型としてGC rich な配列を除いた、第二エクソンから第五エクソンを nested PCR によって増幅しようと試みた。その結果、目的の約6 Kbp のPCR産物を得ることができた。このPCR産物を pGEM-T easy vector に組み込み、クローニングした後、DNA塩基配列を確認した結果、*SOD2* の第2エクソンから第5エクソンを含んでいることを確認した。

### 3.2.2 *SOD2* 破壊用ベクターの作製

得られた *SOD2* のゲノムDNAのうち、ターゲットとなる配列を検索、*SOD2* の活性中心である、Mn イオンの結合サイトをジーンターゲッティングの標的にした。Mn イオンの結合サイトは、*SOD2* の第2、3、4、5 エクソンそれぞれに1つから2つ存在している。左右両端に数千塩基対の相同性のある配列があると、ジーンターゲッティングの効率が良いことが知られているので、ターゲッティングベクターの左右に十分な長さのDNAを付加するために、中央の第3エクソンのMn イオンの結合サイト(His 81)に薬剤マーカーを挿入することにした。そこで、Fig. 3-1 のような手順で第3エクソンの両端に *Bam*HI サイトを挿入し、第3エクソン全長を除いたベクターを作製した。最後に薬剤耐性マーカーを挿入して、*SOD2* の破壊用ベクターを作製した。



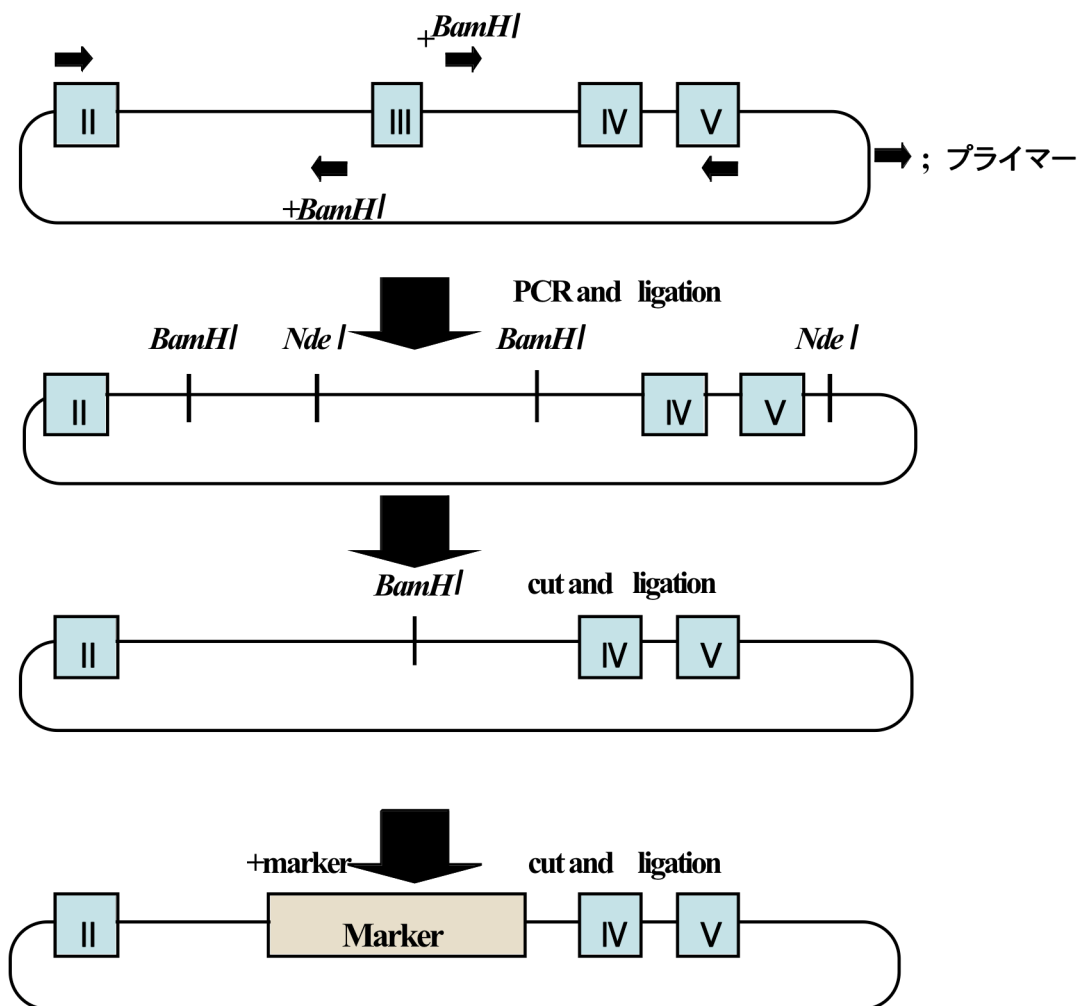


Fig. 3-1 SOD2 破壊用ベクター作製のストラテジー

### 第3節 ヒト SOD2-HA/Tet-off ベクターの作製

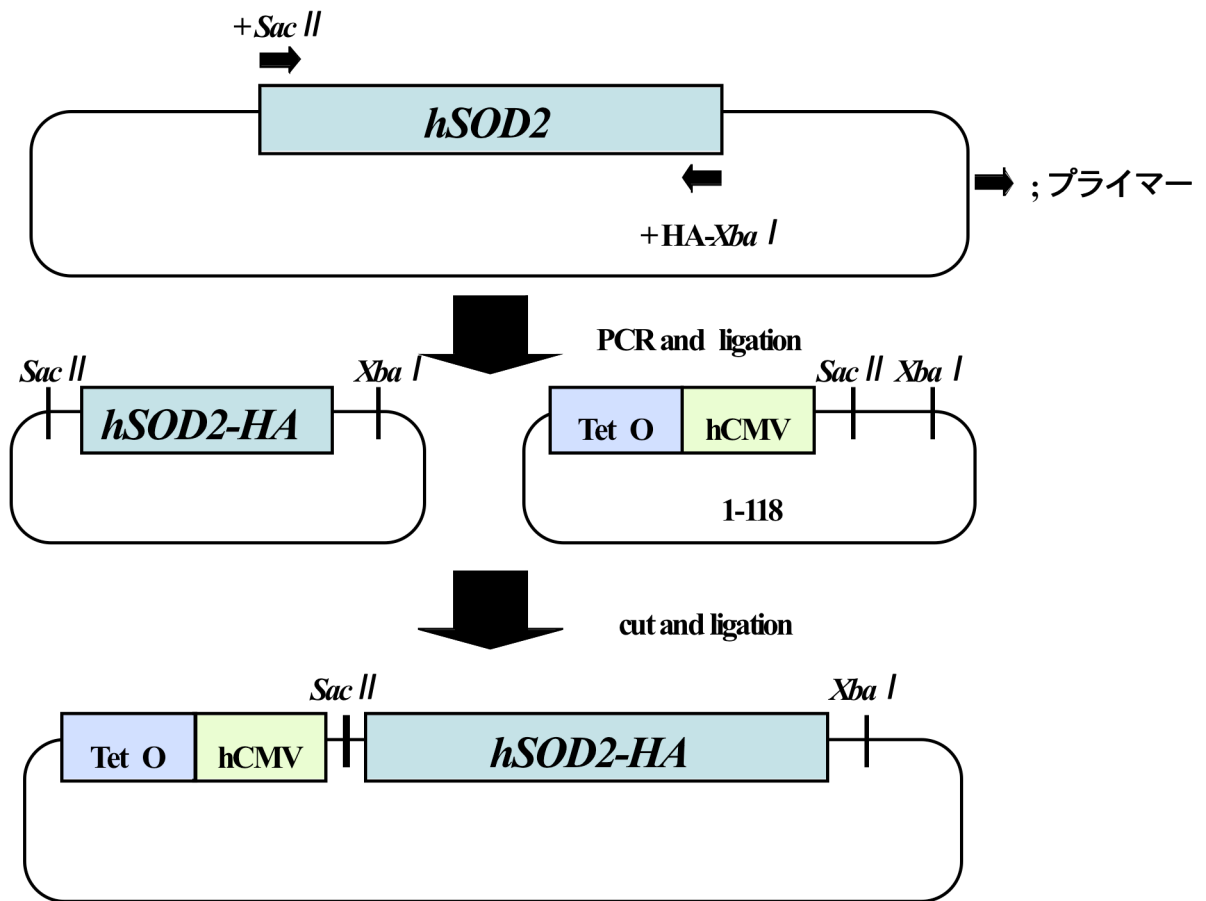
SOD2 ノックアウトマウスは、個体レベルでは致死であり、細胞レベルでも非常にシックであることが報告されている。従って、DT40 の SOD2 破壊株も作製前は致死である可能性が考えられた。また、もし作製できたとしても、破壊当初から酸化ストレスを受け続けるため、正確な表現型を観察できない可能性があった。そこで、Tet-off system で発現を停止できるヒト SOD2 発現系を導入後、トリ SOD2 を破壊することにより、SOD2 条件破壊株を作製することとした。

#### 3.3.1 ヒト SOD 2 cDNA のクローニング

ヒト子宮頸癌細胞である HeLa 細胞から mRNA を抽出し、cDNA を合成した。これを鋳型として PCR を行い、ヒト SOD2 cDNA を増幅した。この PCR 産物を pGEM-T easy vector に組み込み、クローニングした。DNA 塩基配列を確認した結果、ヒト SOD2 cDNA であることを確認した。

#### 3.3.2 ヒト SOD2-HA/Tet-off ベクターの作製

得られたヒト SOD2 cDNA を Tet-off system 導入用ベクターである 1-118 ベクターに組み込むために、Fig. 3-2 のようにヒト SOD2 cDNA に制限酵素サイトを導入し、そのサイトを利用して 1-118 ベクターに組み込んだ。



**Fig. 3-2** ヒト SOD2-HA/Tet-off ベクター作製のストラテジー

## 第4節 SOD2条件破壊株の作製

### 3.4.1 *SOD2*<sup>+/+</sup>株の作製

まず、DT40 野生株に対して、Fig. 3-1 のようにして得られた *SOD2* 破壊用ベクターをトランスフェクションし、*SOD2*<sup>+/+</sup>株の樹立を試みた。しかしながら、トランスフェクション後、geneticin に対して耐性を獲得したコロニーは生えてくるものの、ゲノム DNA を抽出しゲノム PCR によって *SOD2*<sup>+/+</sup>株の樹立を確認しようとしたところ、1 クローンも破壊を確認することができなかった。そこで、プライマーを複数個試したものの、それでも確認は不可能だった。ここで再度、データベースによって *SOD2* のゲノム DNA 配列を確認したところ、以前に、破壊用コンストラクトを作製した時に確認した配列と、プライマーを設計していた第一エクソンの配列が多少異なっていることが分かった。そこで、この配列をもとに新たにプライマーを設計し、破壊を確認したところ、*SOD2*<sup>+/+</sup>株の樹立を確認することができた。(24 クローン中 2 クローン: 8.3 %)

### 3.4.2 Tet-off system の導入

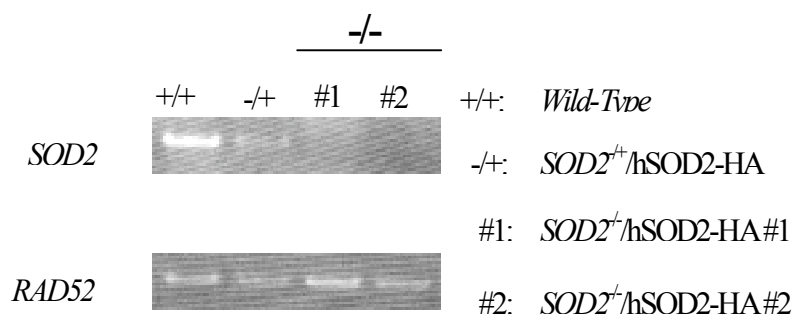
次に、*SOD2*<sup>+/+</sup>株に Tet-off system で hSOD2 を発現させるために、作製した hSOD2-HA/1-118 ベクターおよび 1-128 ベクターをトランスフェクションした。Hygromycin B に対して耐性を獲得したコロニーから cDNA を抽出し、hSOD2-HA の発現を RT-PCR によって確認した結果、発現を観察することができた。(4 クローン中 1 クローン: 25 %)

### 3.4.3 *SOD2*<sup>+/+</sup>hSOD2-HA 株の作製

最後に、残されたもう 1 つの *SOD2* 遺伝子を破壊するため、もう一度 *SOD2* 破壊用ベクターをトランスフェクションし、得られたマイコフェノール酸耐性コロニーのゲノム DNA を抽出し、ゲノム PCR によりジーンターゲットングの有無を確認した結果、複数のクローンで破壊が確認された。(96 クローン中 3 クローン: 3.1 %)更に、ゲノム PCR の結果が陽性だったクローンを RT-PCR とサザ

ンブロッティングによって  $SOD2^{-/+}$ /hSOD2-HA 株の樹立を確認した。

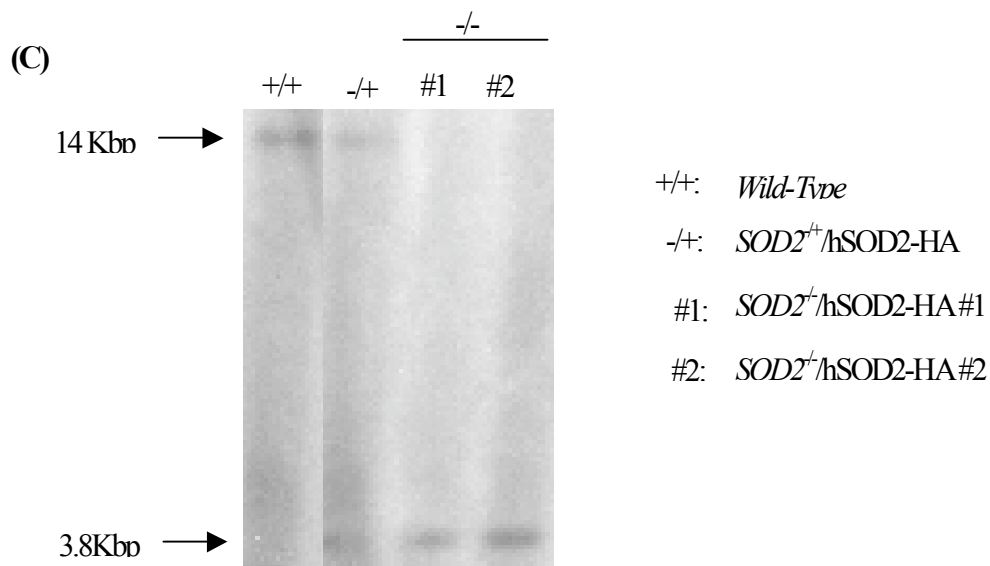
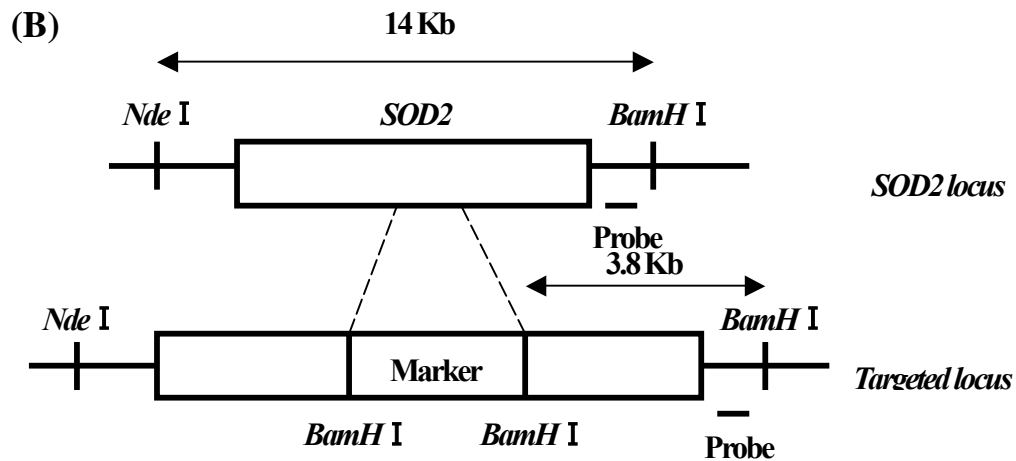
(A)



**Fig. 3-3**  $SOD2^{-/+}$ /hSOD2-HA 株の作製

(A) RT-PCR

各細胞株から total RNA を抽出し、各プライマーを用いて RT-PCR を行った。2 クローンにおいて *SOD2* が破壊されていることを確認した。*RAD52* は positive control である。



**Fig. 3-3 続き**

(B) サザンブロッティングのストラテジー

(C) サザンブロッティング

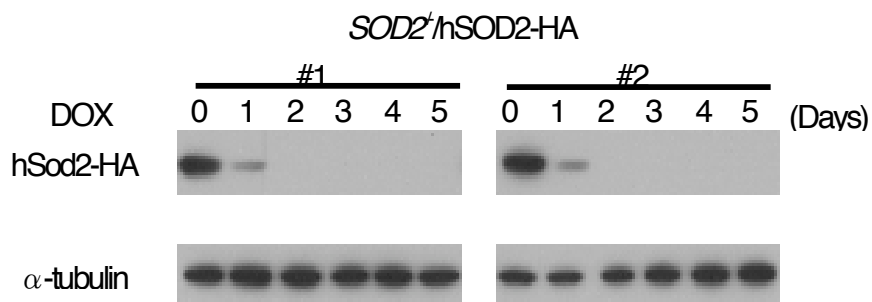
各細胞からゲノム DNA を回収し、(B)のように制限酵素処理し、サザンブロッティングを行った。その結果、SOD2 の破壊が確認された。

## 第4章 SOD2 条件破壊株の表現型の解析

### 第1節 SOD2 枯渇による経時的変化

#### 4.1.1 ドキシサイクリン添加後のhSOD2 の消失

樹立したSOD2 条件破壊株に導入したtet-off system が正常に機能しているのかを確認するために、ドキシサイクリン添加後のhSOD2 存在量の変化を時間をおって測定した。その結果、得られた2つのクローン(#1 と#2)どちらも、ドキシサイクリン添加によってhSOD2 が消失していき、2 日目にはウエスタンブロット法の検出限界以下まで発現量が低下することがわかった。(Fig4-1)



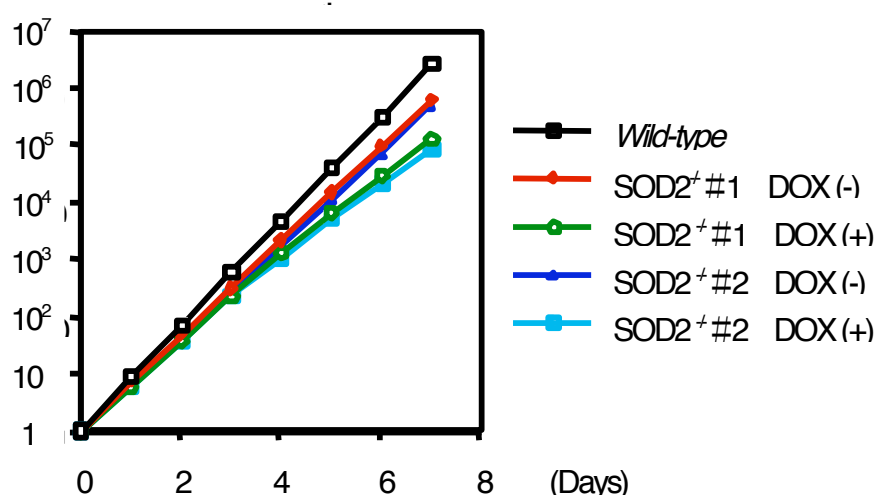
**Fig.4-1** ドキシサイクリン添加後のhSOD2 の消失

細胞をドキシサイクリン(20ng/mL)存在下で図に示した時間培養した後、細胞を回収し、SDS-PAGE でタンパク質を展開して各抗体で検出した。

#### 4.2.2 細胞増殖曲線

Sod2 ノックアウトマウス由来繊維芽細胞は、野生株と比較し細胞増殖能が非常に低いことが報告されている(Samper, E., et al. 2003)。また、Sod2<sup>-/-</sup>マウス由来の神経細胞は通常の酸素濃度下では致死であることが知られている(Liu, J., et al. 2006)。そこで、SOD2 の消失がDT40 の細胞増殖能に

影響を与えるのか検討するために、 $1 \times 10^6$  細胞をドキシサイクリン添加培地に播き、24 時間ごとにトリパンブルーで染色されなかった細胞数を計測し、hSOD2 の消失が細胞増殖に及ぼす影響を調べた。その結果、hSOD2 が消失するドキシサイクリン添加後 2 日目までは、添加しない場合と比べほとんど細胞増殖能に変化は観察されなかったが、4 日から 5 日目になると徐々に細胞増殖能が低下していった。(Fig. 4.2)



**Fig. 4.2** 細胞増殖曲線

各細胞株を、39°Cでドキシサイクリン添加、あるいは未添加の培地で培養し、24 時間ごとにトリパンブルーに染まらない生細胞数を計測し、播いた時の細胞数と比較した。

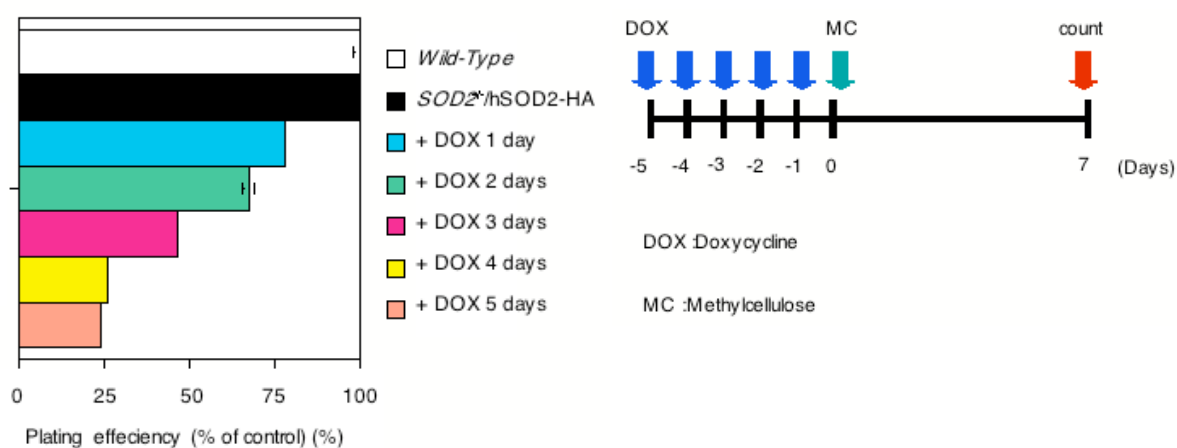
#### 4.1.3 コロニー形成率

細胞増殖曲線の結果から、SOD2 の消失は直ちに細胞増殖に影響を与える訳ではなく、経時的に表現型が強くなっていくことが予想された。そこで、細胞の生存率を測定する目的で、ドキシサイクリン存在下で1日から5日間培養したSOD2 条件破壊株をメチルセルロース培地に播き、



39 °Cで培養したときのコロニー形成率を測定した。(野生株で生えてきたコロニー数を 100%としている。)

その結果、ドキシサイクリン添加前は野生株とほぼ同程度だったコロニー形成率が、経時的に低下していき、4 日から 5 日目にはほぼ 25%程度まで低下した。しかし、細胞増殖能と同様に表現型の悪化は4 日から 5 日目では終了し、それ以上悪化することはない。そこでこれ以降 SOD2 の表現型を観察する際には、基本的にはドキシサイクリン添加 5 日目の細胞を使用することにした。(Fig.4.3)



**Fig.4.3** メチルセルロース培地中でのコロニー形成率

細胞をドキシサイクリン添加培地で図に示した時間培養後回収して、メチルセルロース培地に播き、7日間培養後、生えてきたコロニー数を計測した。野生株のコロニー数を 100 %とした。図中のバーは標準偏差を示す。

## 第2節 各種 ROS に対する感受性

### 4.2.1 パラコート感受性

ノックアウトマウス由来の *Sod2*<sup>-/-</sup>細胞は、スーパーオキシドを細胞内で過剰に発生させる薬剤の1種であるパラコートに強い感受性を示すことが報告されている(Huang *et al.*, 1997)。その他にも、RNAi 法によってショウジョウバエから SOD2 をノックダウンすることによっても、同様の結果が得られている(Paul *et al.*, 2007)。そこで、DT40 *SOD2* 条件破壊株でも同様に強い感受性を示すか検討するために、ドキシサイクリン添加後 5 日目までの *SOD2* 条件破壊株をパラコート (200  $\mu$ M) で 24 時間処理したときのパラコート感受性をフローサイトメトリーを用いて PI 単染色によって観察した。PI は DNA と複合体を形成することで蛍光を発するが、死細胞のみ PI が入り込むことが可能なため、PI 陽性の細胞を検出することで、死細胞の割合を測定できる。その結果、野生株ではほとんど死細胞が増加しない条件下でも、*SOD2* 発現停止後、*SOD2* 条件破壊株ではパラコート処理によって経時的に死細胞の割合が顕著に増加していく様子が観察された (Fig. 4.4)。

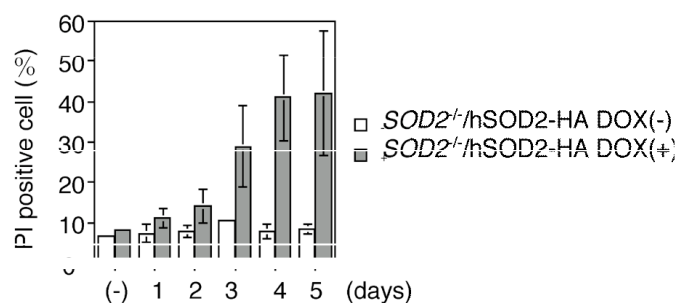


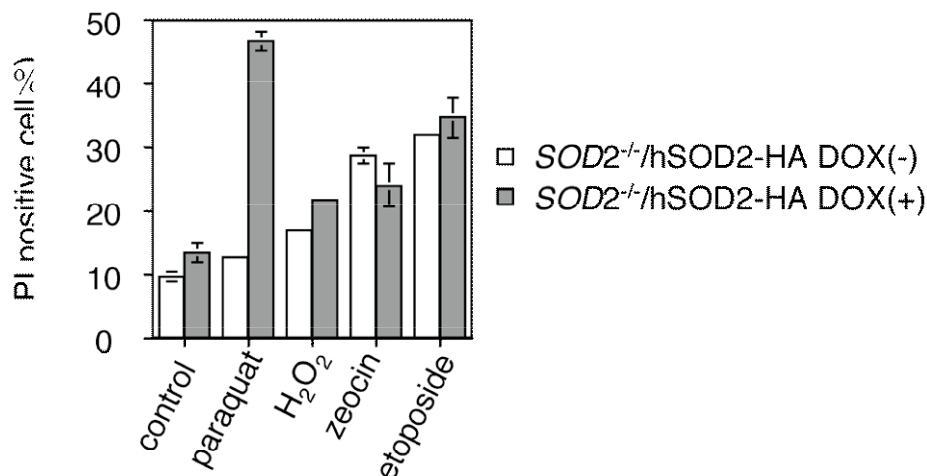
Fig. 4.4 ドキシサイクリン添加後のパラコート感受性

細胞をドキシサイクリン(20 ng/mL)存在下で図に示す時間培養後、パラコート (200  $\mu$ M) で 24 時間処理した。細胞を回収後、PI で染色し、フローサイトメトリーによって PI 陽性の細胞の割合を測定した。

#### 4.2.2 その他ROSに対する感受性

他種のSOD2<sup>-/-</sup>細胞の過酸化水素など、SOD2がその除去に関与しないROSに対するの感受性は報告によって異なる。そこで、DT40細胞では感受性を示すか検討するために、SOD2が直接除去に関与しないROSを発生させる、過酸化水素、ゼオシン、エトポシドで処理した際の死細胞の増加を4.2.1と同様にPI単染色によるフローサイトメトリーで観察した。

その結果、パラコートとは異なり、過酸化水素、ヒドロキシラジカルを発生させるゼオシンや、トポイソメラーゼ II阻害剤であると共にROSを発生させるエトポシドに対する感受性はドキシサイクリンを加えない場合とほぼ同程度であった。(Fig.4.5)



**Fig.4.5** SOD2 枯渇時の各ROS 発生試薬感受性

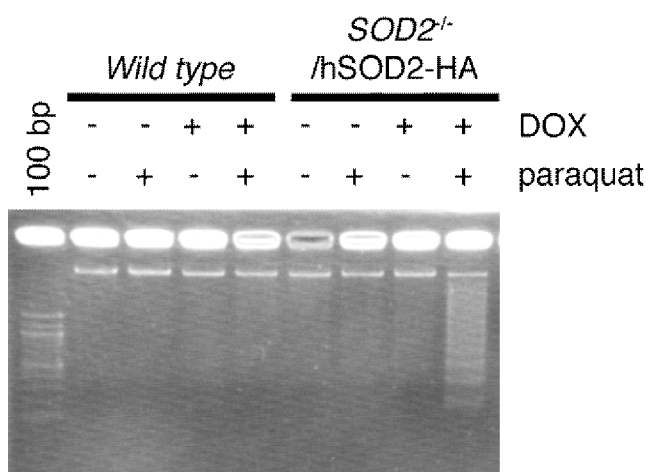
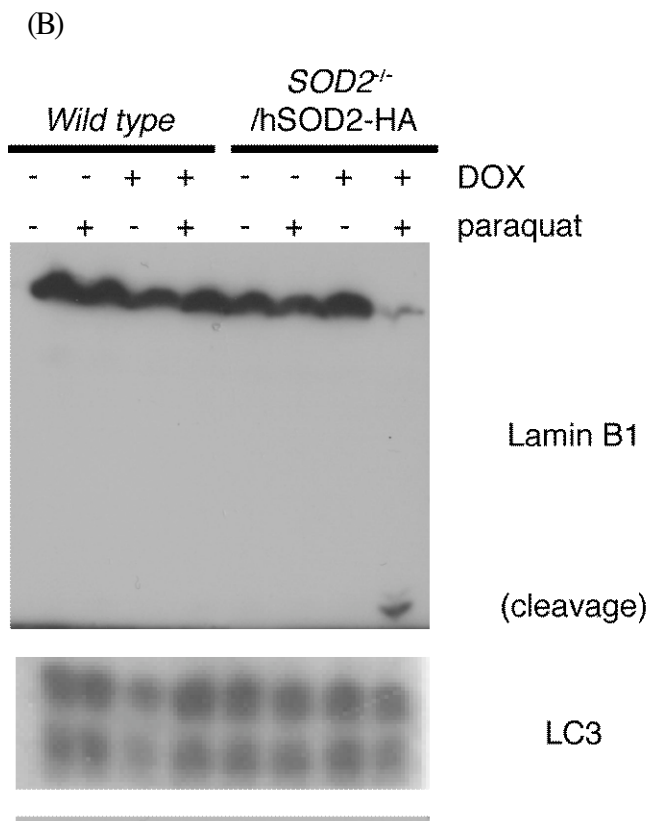
SOD2 条件破壊株をドキシサイクリン(20ng/mL)存在下で5日間培養した後、パラコート(200 μM)で24時間、過酸化水素(500 μM)で6時間、zeocin(500 μg/mL)で24時間、etoposide(10 μM)で6時間処理した。細胞を回収後、PIで染色し、フローサイトメトリーによってPI陽性の細胞の割合を測定した。

### 第3節 パラコート感受性増大の原因

#### 4.3.1 アポトーシスとオートファジーの検出

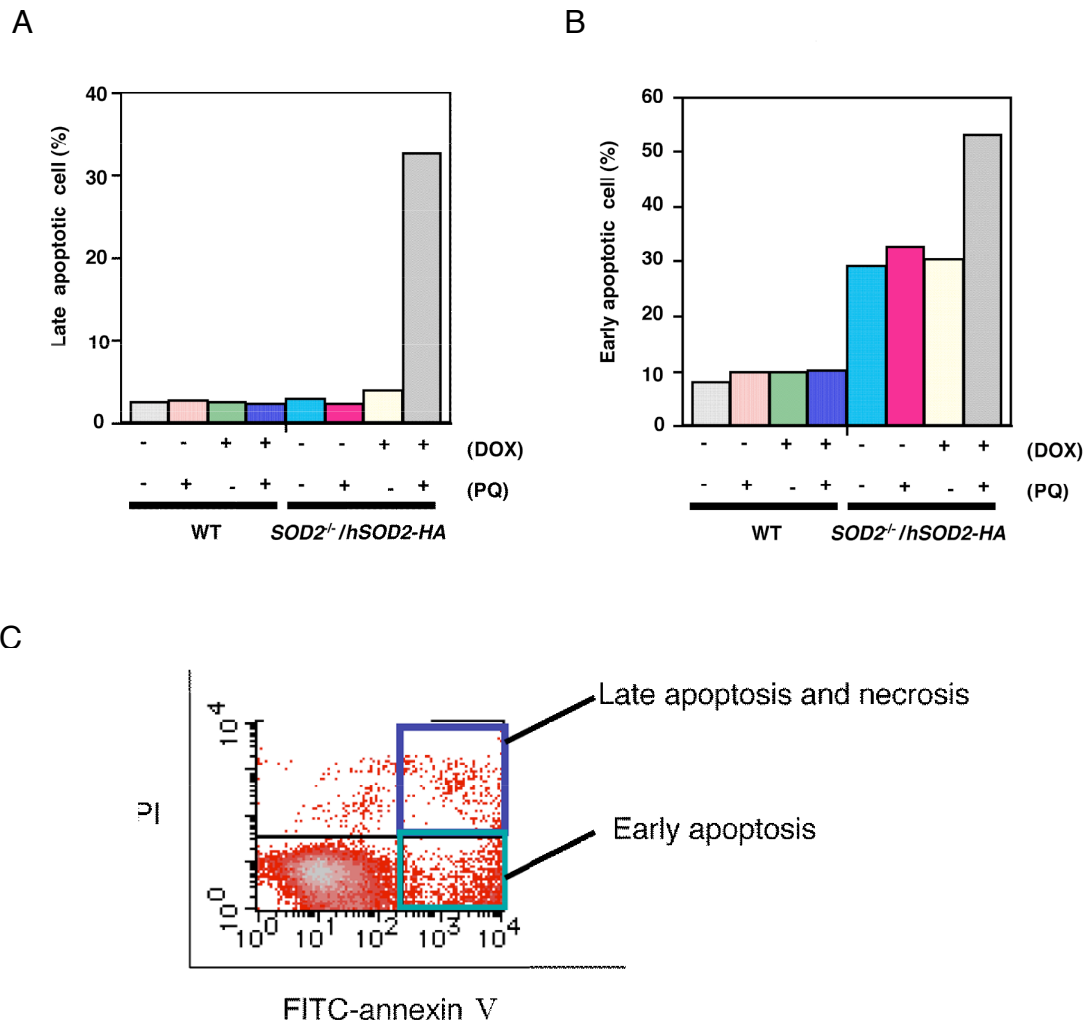
*SOD2* 条件破壊株がパラコートに対して高い感受性を示す原因を解析するために、4.2.1と同様の条件で細胞死の1種であるアポトーシスやオートファジーの検出を行った。アポトーシスの指標としては、核膜裏打ちタンパク質のLaminB1の分解、ヌクレオソーム単位でのDNAの断片化(DNA Ladder)、初期アポトーシスの指標であるAnnexin VとPIによる2次元フローサイトメトリーを用い、オートファジーの指標としてはLC-3の増加を用いた。

その結果、ドキシサイクリン添加して5日間培養した*SOD2* 条件破壊株では、パラコートによって、LaminB1の分解やヌクレオソーム単位でのDNAの断片化が観察され、アポトーシスが顕著に亢進することが明らかになった。しかしながら、LC-3の増加は検出されなかった(Fig4-6)。



**Fig. 4-6** アポトーシスとオートファジーの検出 (1)

(A) 野生株および*SOD2* 条件破壊株をドキシサイクリン(20ng/mL)存在下で5日間培養した後、パラコート(200 μM)で24時間処理した。細胞を回収後、SDS-PAGEにより展開し、各抗体で検出した。(B) (A)と同様の条件でパラコートを処理し、細胞を回収後にゲノムDNAを抽出し、アガロース電気泳動で展開した。



**Fig 4-6** アポトーシスとオートファジーの検出 (2)

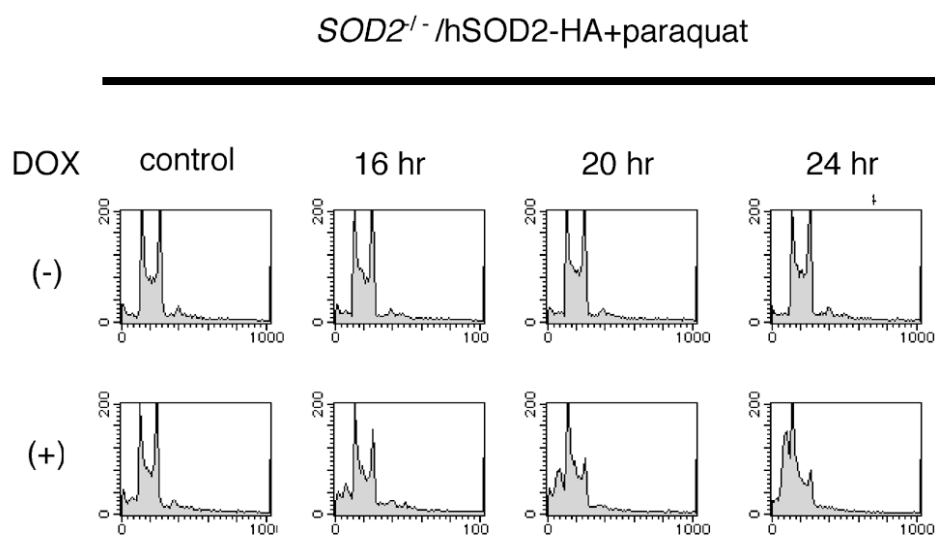
(A) 野生株および*SOD2* 条件破壊株をドキシサイクリン(20 ng/mL)存在下で5 日間培養した後、パラコート(200  $\mu$ M) で24 時間処理した。細胞を回収後、フローサイトメトリーによってlate apoptosis 細胞を検出した。

(B) (A)と同様の方法でearly apoptosis 細胞を検出した。

#### 4.3.2 パラコート処理の細胞周期への影響

次に、パラコートによって誘発されるアポトーシスが細胞周期特異的に発生するのかが検討するために、パラコートを処理した際の細胞周期の変化を Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit を用いて検討した。

その結果、DOX 処理細胞はパラコート処理することで、S 期と G<sub>2</sub>/M 期の細胞群が徐々に減少し始め、24 hr 後には S 期と G<sub>2</sub>/M 期に在る細胞群がほぼなくなった。代わりに、死細胞を示す sub G<sub>1</sub> 期の細胞群が増加し、S 期と G<sub>2</sub>/M 期の細胞が特異的にパラコート処理によってアポトーシスが起きていることが分かった(Fig. 47)。



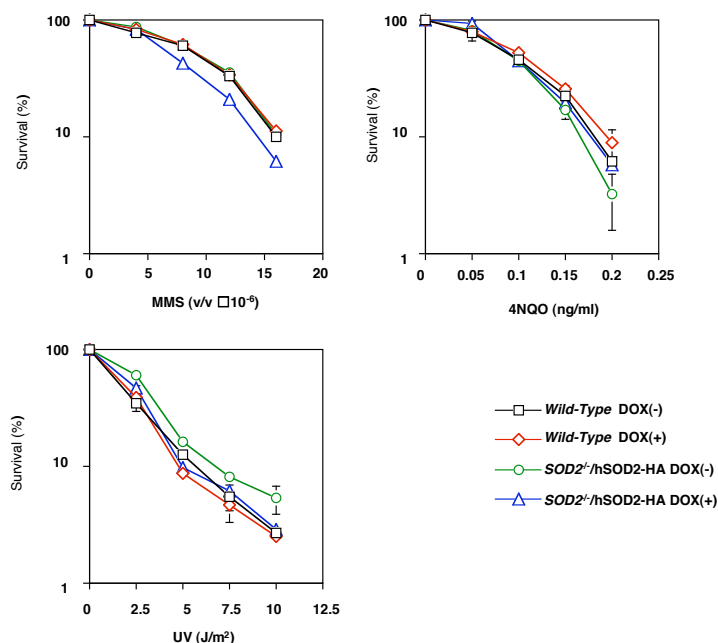
**Fig. 47** パラコート処理による細胞周期への影響

*SOD2* 発現下と枯渇下で、*SOD2* 条件破壊株にパラコート(200  $\mu$ M) を図に示した時間処理した。細胞を回収し、Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit を用いて、細胞周期分布をフローサイトメトリーで解析した。

## 第4節 DNA 傷害剤に対する感受性

### 4.4.1 DNA 傷害剤に対する感受性

次に、SOD2 の消失によって起こると予測される過度の酸化ストレスがゲノム安定性に影響を与えるか検討するために、DNA 傷害剤および、紫外線 (UV) に対する感受性を観察した。使用した薬剤は、DNA アルキル化剤で、DSBs を誘発するとされている MMS、UV に近い傷害を DNA に与えるといわれている 4NQO で、DNA 傷害剤については薬剤含有メチルセルロース培地で培養後、生えてきたコロニー数を測定した。UV の場合は培地に蒔く前に照射した。その結果、SOD2 が消失しても、DNA 傷害剤および UV に対する感受性はほぼ野生株と同程度で、顕著な変化は観察されなかった (Fig. 48)。



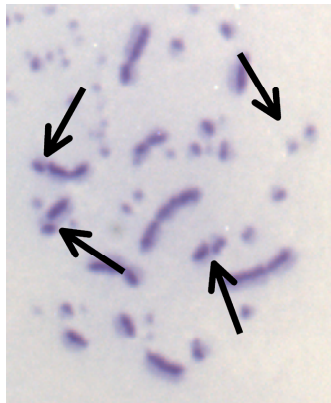
**Fig. 48** SOD2 枯渇時の薬剤感受性

それぞれの濃度の MMS、4NQO 含有メチルセルロース培地で 7 から 14 日間培養し、生えてきたコロニーを測定した。図中のバーは標準偏差を示す。



#### 4.4.2 姉妹染色分体間交換 (SCE) の測定

当研究室や他の研究グループの報告より、SCE は相同組換え機構 (HRR) によって形成され、姉妹染色分体間の cross over type の HRR により形成されることが示されており、DNA 損傷によってその頻度が亢進する。この SCE 頻度を指標に、SOD2 の消失によって起こると予測される過度の酸化ストレスがゲノム DNA に損傷を与えるかどうかを検討した。その結果、ドキシサイクリン添加5日目の *SOD2* 条件破壊株でも、野生株とほぼ同程度の SCE 頻度しか観察されなかったことから、SOD2 の消失によって少なくとも SCE で検出可能なゲノム DNA の損傷が起こっていないことが示唆された(Fig. 49)。

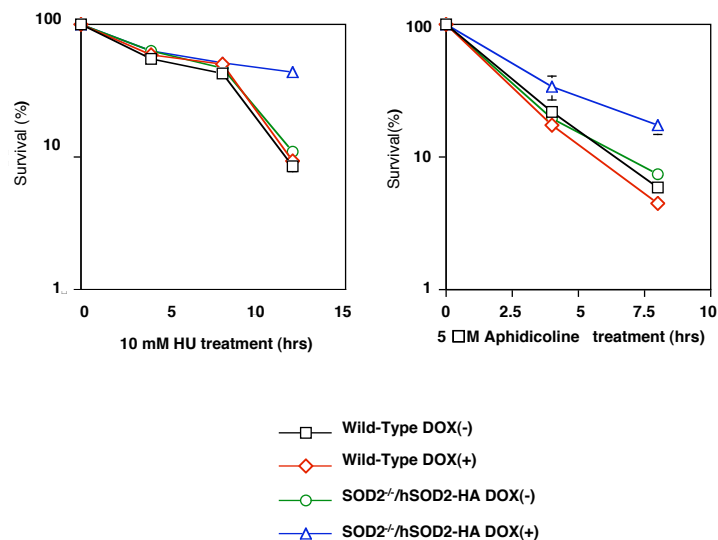
genotype	mean $\pm$ standard deviation	
Wild Type	2.18 $\pm$ 1.21	
<i>SOD2</i> <sup>-/-</sup> / <i>hSOD2</i> -HA DOX (-)	2.16 $\pm$ 1.25	
<i>SOD2</i> <sup>-/-</sup> / <i>hSOD2</i> -HA DOX (+)for 5 days	2.16 $\pm$ 1.47	

**Fig. 49** 自発的な姉妹染色分体交換頻度

BrdU を2細胞周期(165 時間) 取り込ませた細胞をコルセミド存在下で2 時間培養後、プレパレートを作製し、分染処理した。50 個のM 期の細胞について SCE を測定した。数字は平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。

#### 4.4.3 DNA 合成阻害剤に対する感受性

出芽酵母において、*sod1* 破壊株は、DNA 合成阻害剤である hydroxy urea に対して顕著な感受性を示すことが知られている(Carter *et al.*, 2005)。そこで、酸化ストレスが DNA 複製、DNA 代謝に関与している可能性を考え、DNA 合成阻害剤である hydroxy urea および aphidicoline に対する感受性を調べた。予想外なことに、SOD2 の消失によって、HU および aphidicoline に対して耐性を示すことが明らかになった(Fig. 4-10)。



**Fig. 4-10** *sod2* 枯渇時の薬剤感受性

細胞を HU あるいは Aphidicoline で図に示した時間処理した後、薬剤を洗浄し、細胞をメチルセルロース培地で 7 から 14 日間培養して生えてきたコロニーを数えた。図中のバーは標準偏差を示す。

第5節 細胞周期の進行

4.5.1 細胞周期分布の変化

SOD2 の発現停止によって、細胞増殖能が低下することが明らかとなった。そこで、この細胞増殖能低下の原因を探るために、SOD2 枯渇後と枯渇前で細胞周期の分布を比較検討した。対数増殖期にある細胞を BrdU (bromodeoxyuridine) の含有培地で 10 分培養し、その後 BrdU Flow Kit にて標核化し、BrdU の取り込み量と DNA 含量を flow cytometry により測定することで各細胞周期の分布を調べた。その結果、野生株と SOD2 枯渇前の SOD2 条件破壊株は同様の細胞周期分布を示したが、SOD2 枯渇後は、G<sub>1</sub> 期の細胞群が増加し、S 期の細胞群が減少した(Fig. 4-11)。

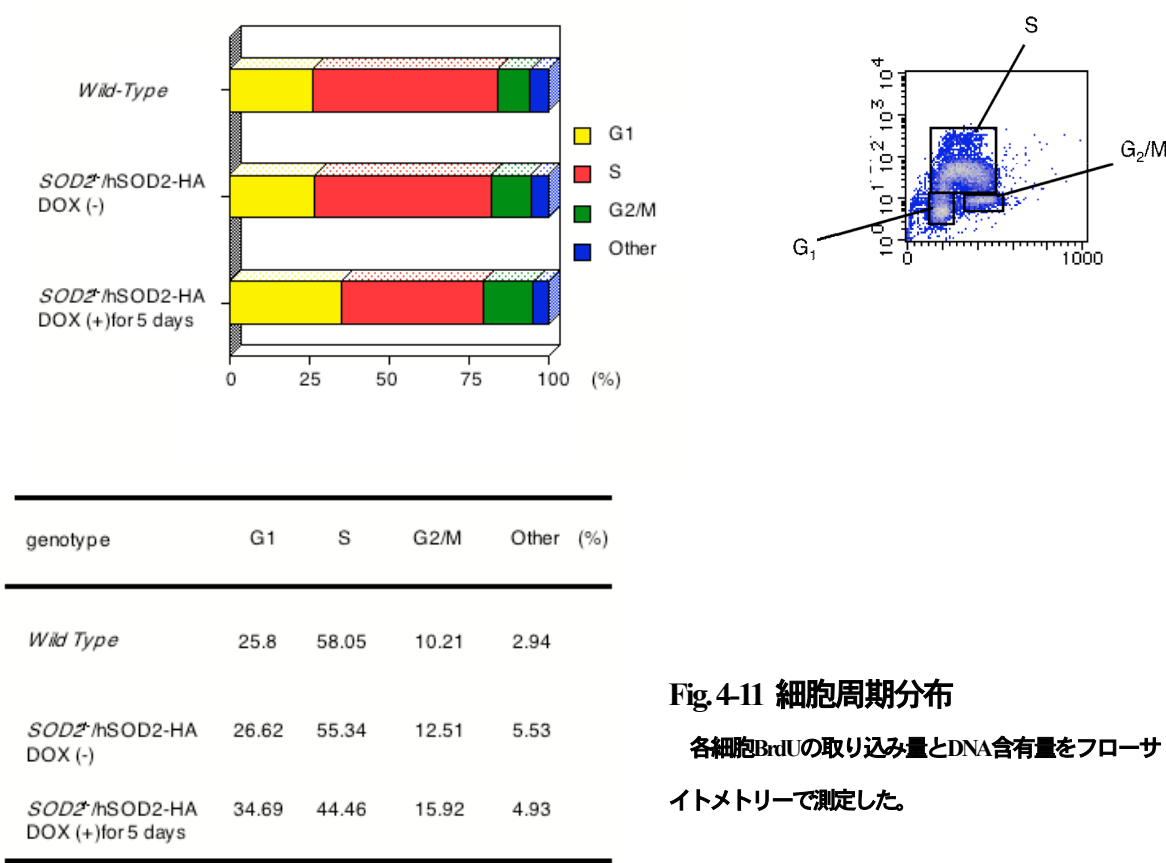
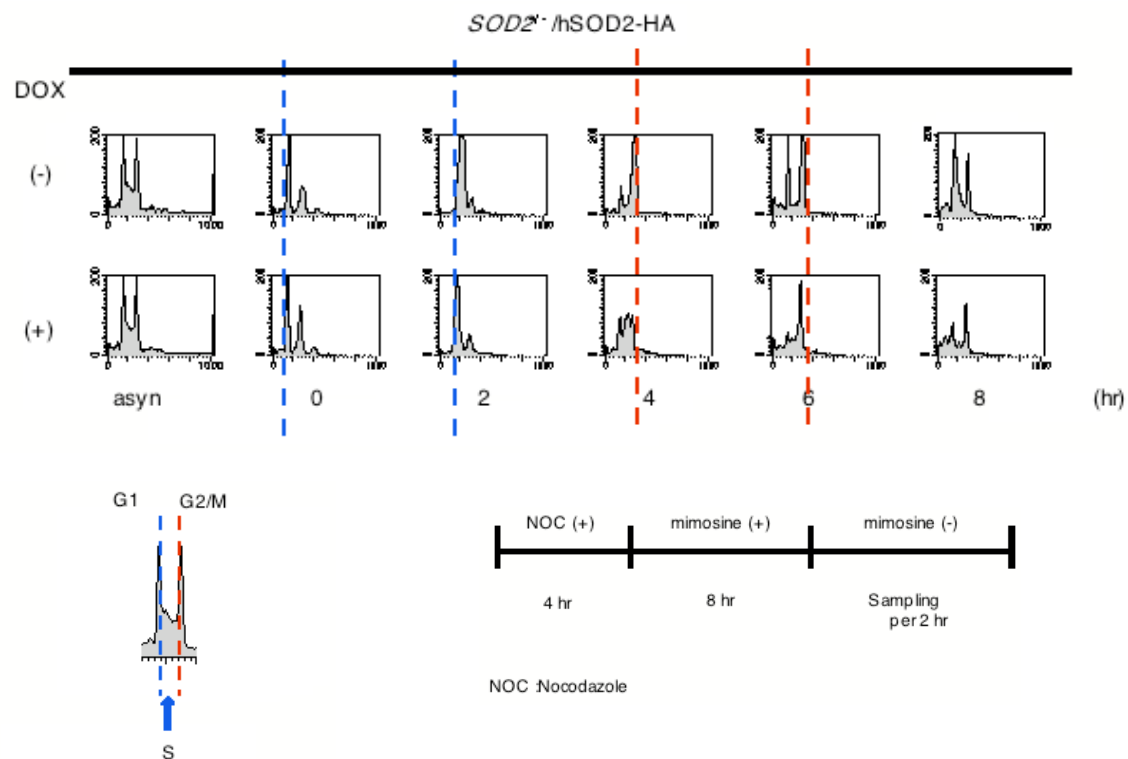


Fig.4-11 細胞周期分布  
各細胞BrdUの取り込み量とDNA含有量をフローサイ  
トメトリーで測定した。

#### 4.6.2 同調後の細胞周期の進行

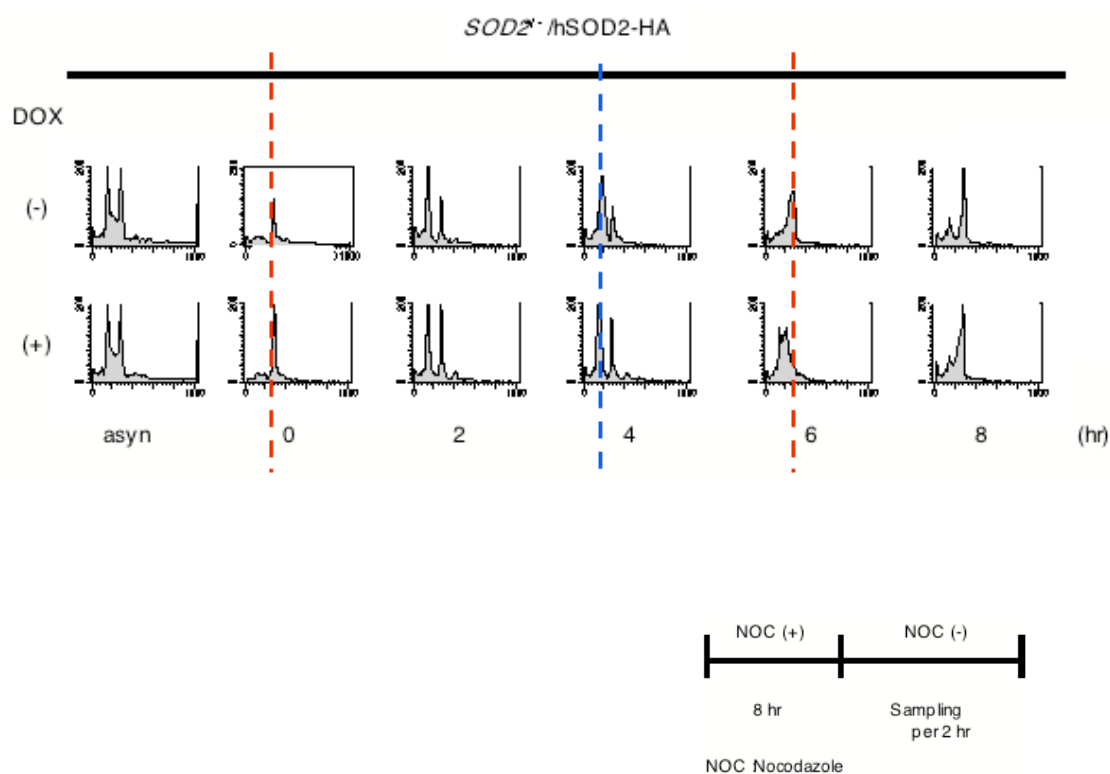
細胞周期分布の解析から、SOD2 の発現停止によって、G<sub>1</sub> 期から S 期への移行が遅延する可能性が示唆された。そこで、SOD2 枯渇下で本当に G<sub>1</sub> 期から S 期への移行の遅延が見られるかどうかを明らかにするために、微小管重合阻害剤である nocodazol で4 時間処理し G<sub>2</sub>/M 期に細胞を誘導し、培地を洗浄後、更に mimosine で8 時間処理し、G<sub>1</sub> 期に同調させた。その後培地を洗浄し、細胞周期を再進行させたときの様子を Cycle TEST™PLUS DNA Reagent Kit を用いて観察した。その結果、やはり SOD2 枯渇下では G<sub>1</sub> 期から S 期への移行の遅延が観察された。また、その後の細胞周期の進行を観察した結果、S 期の進行自体も遅延が観察された(Fig. 4-12)。



**Fig. 4-12** SOD2 枯渇時の細胞周期の遅延 (1)

細胞を G<sub>1</sub> 期に同調後、薬剤を洗浄して除き、細胞周期を進行させた。2 時間ごとに細胞を回収し、Cycle TEST™PLUS DNA Reagent Kit を用いたフローサイトメトリーで測定した。

しかしながら、nocodazol-mimosine block では完全にG<sub>1</sub>期に同調させることができず、この結果の信頼性は低いと考えられた。しかし、これ以上長期間 mimosine を処理すると死細胞が多くなることが予想された。そこで、nocodazol 単独で細胞を G<sub>2</sub>/M 期に同調し、その後培地から nocodazol を除き、細胞周期を進行させた。その結果、nocodazol-mimosine block と同様の結果が得られた(Fig. 4-13)。



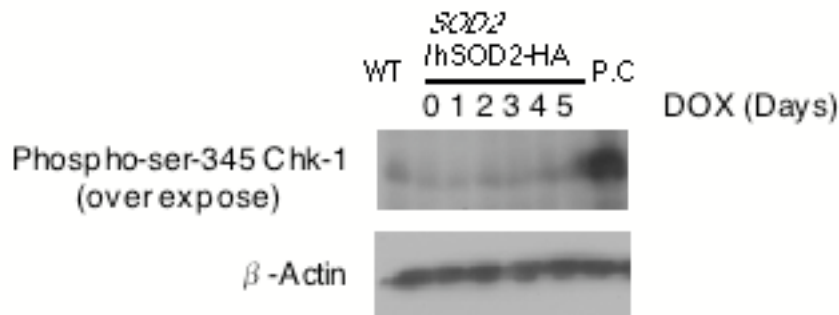
**Fig. 4-14** SOD2 枯渇時の細胞周期の遅延 (2)

細胞を G<sub>2</sub>/M 期に同調後、薬剤を洗浄して除き、細胞周期を進行させた。2 時間ごとに細胞を回収し、CycleTEST<sup>TM</sup> PLUS DNA Reagent Kit を用いたフローサイトメトリーで測定した。

#### 4.6.3 DNA複製チェックポイント機構

DNA複製機構に何らかの障害が生じた場合、DNA複製チェックポイントが活性化する。この機構は、① DNA修復などに必要な時間だけDNA複製を停止させる。② もしそれが不可能な場合はアポトーシスを誘導することによってゲノム安定性の維持に関与している。

SOD2枯渇時に起こるS期の進行の遅延が、DNA複製機構に何らかの障害が起こり、DNA複製チェックポイントが活性化された結果である可能性を考え、DNA複製チェックポイント因子の一つである、Chk-1の活性化(Ser345のリン酸化)をSOD2枯渇時に検出した。その結果、SOD2が枯渇しても、Chk-1の活性化は全く検出されず(overexposeしてもほとんど変化は検出されなかった)、S期の進行の遅延の原因がDNA複製チェックポイントの活性化によるものではないことが示唆された(Fig. 4-14)。



**Fig. 4-14** Chk-1のリン酸化の検出

*SOD2*条件破壊株にドキシサイクリンを添加後、1から5日目の細胞を回収し、SDS-PAGEでタンパク質を展開後、ヒトリン酸化Chk1抗体で検出した。positive controlは、HU(10mM)を15hr処理した野生株を用いた。

#### 4.6.4 DNA 複製フォークの進行速度

SOD2 枯渇時に起こる S 期進行の遅延の原因として、もう一つ考えられるのが DNA 複製フォークの進行速度の低下である。複製フォークの安定性が低下すると、複製フォークの進行速度の低下が起きることが知られている。

そこで、複製フォークの進行速度を測定するために、DNA fiber assay を行った。(この assay は、当研究室 秋田により行われた。) まず、標識塩基となる CldU、IdU をそれぞれ短時間ずつ DNA に取り込ませ、DNA をスライドガラス上で伸長させた後、それぞれの標識塩基抗体で免疫染色し、CldU、IdU が取り込まれた DNA の長さを測定した。その結果、野生株と比較して、SOD2 条件破壊株は SOD2 枯渇前でも複製フォークの進行速度の低下が観察されたが、SOD2 枯渇後との差はそれほど観察されず、複製フォークの進行速度の低下が SOD2 枯渇時に起こる S 期進行の遅延の主な原因ではないことが示唆された。

genotype	mean± standard deviation (um/min)	
	CldU	IdU
Wild Type	1.77±0.79	0.62±0.21
<i>SOD2</i> <sup>+/+</sup> /hSOD2-HA DOX(-)	1.47±0.80	0.48±0.19
<i>SOD2</i> <sup>+/+</sup> /hSOD2-HA DOX(+)	1.31±0.52	0.46±0.26

**Fig. 4-15** DNA 複製フォークの進行速度

各細胞に CldU、IdU を取り込ませた後 DNA を伸長させ、各標識塩基抗体で染色し、CldU、IdU が取り込まれた DNA の長さを測定した。RAD17 は Positive control である。

## 第5章 考察

活性酸素種 (ROS) と、それを消去する抗酸化酵素は老化、神経疾患や癌、生活習慣病の発症など、多種多様な現象に関与することが分かり、ROS や抗酸化酵素の細胞内における役割が徐々に明らかになりつつある。このような状況のなかで、当研究室で精力的に研究が進められている RecQ ヘリカーゼの出芽酵母ホモログである Sgs1 と Sod1 の遺伝子二重破壊株が合成致死になることが明らかとなった(Tong *et al.*, 2001)。そこで当研究室では、抗酸化酵素のゲノム安定性維持や細胞周期進行への寄与を解析するプロジェクトが発足し、このプロジェクトの一端として、本研究では DT40.SOD2 条件破壊株を作製し、抗酸化酵素 SOD2 欠損時に発生する酸化ストレスがゲノム安定性および細胞周期の進行にどのような影響を与えるのか、解析を行った。本研究では SOD2 条件破壊株を用いて、SOD2 の枯渇が細胞周期の進行やアポトーシス等に影響を与えることを示す結果を得ることができた。本章では、これらの結果を中心に考察する。

### SOD2 の発現停止によって経時的に表現型が顕著になる

SOD2 条件破壊株の培養系にドキシサイクリンを添加して SOD2 の発現を停止させると、細胞増殖能が経時的に低下した(Fig. 4.2)。また、ドキシサイクリン存在下で1日から5日間培養した細胞のメチルセルロース培地におけるコロニー形成率を計測した結果、コロニー形成率の経時的な低下が観察された(Fig. 4.3)。しかしながら、致死あるいは細胞増殖の完全な停止といった、Sod2 ノックアウトマウス由来細胞で観察される表現型と比較すると、SOD2 条件破壊株の表現型は予想外に弱いものであった。SOD2 の発現量は組織間で大きな差があることが知られているが、ニワトリの主要な組織由来の細胞の SOD2 発現量を比較した場合、リンパ球の発現量はほぼ平均的であることが報告されており(Kong *et al.*, 2003)、B 細胞由来である DT40 細胞も RT-PCR の結果から、SOD2 の発現量が低いということは考えにくい。したがって、DT40 細胞では SOD2 が



スーパーオキシドの除去に不必要であるという可能性は低い。むしろ、*Sod2* ノックアウトマウス由来の神経細胞は通常の培養条件では致死だが、低酸素下では生存可能であるという報告や、*Sod2* ノックアウトマウス間でも、遺伝的背景によって平均寿命に大きな差が観察されることから、環境的、遺伝的な要因が大きいと考えられる。培養細胞は酸素分圧 20 % の条件であり、体内では 1-2 % の酸素濃度と考えられることから、酸素濃度が大きく影響する可能性がある。また、ノックアウトマウスの表現型は主にミトコンドリアの機能が大きな役割を果たす組織に依存している可能性が高いと考えられる。

#### SOD2 はアポトーシス抑制機構に直接関与しているわけではない

DT40 のミトコンドリア局在型チオレドキシン、TRX2 の DT40 条件破壊株の解析によると、TRX2 はその抗酸化作用とは別に、抗アポトーシス作用を有する Bcl-xl などを紹介し、アポトーシスを抑制する機能を有することが示唆された (TRX2 は MAPKK の 1 種である ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) と結合し、その機能を抑制しているという報告がある) (Tanaka *et al.* 2002, Wang *et al.*, 2006)。では同様にミトコンドリアで機能する抗酸化酵素である SOD2 も、TRX2 のような抗アポトーシス作用があるのだろうか。

SOD2 発現停止直後は、細胞増殖能およびパラコート感受性にほとんど変化は観察されず、数日かけて表現型が徐々に顕著になったこと、SOD2 はパラコートによって誘導されるアポトーシスは抑制するものの (Fig. 4-4, 4-5)、 $H_2O_2$  や DNA 傷害剤であるエトポシドによって誘導されるアポトーシスは抑制しなかったことから (Fig. 4-5)、SOD2 が TRX2 のように、抗酸化作用と別にアポトーシスを抑制する機能を有する可能性は本研究の結果から、低いと考えられる。しかしながら SOD2 がシトクロム c のミトコンドリアからの放出を抑制する (Fujimura *et al.*, 1999) など、アポトーシスに対し、抑制的に機能するといった報告も存在すること、本研究において SOD2 条件

破壊株では hSOD2 発現時においてもアポトーシスが亢進していること（ドキシサイクリン無添加でも *SOD2* 条件破壊株の細胞増殖能が野生株に比べて低下している原因と考えられる。ヒト *SOD2* とニワトリ *SOD2* はミトコンドリア移行シグナルの相同性が低い（ために完全には相補されていない可能性が高い）から（Fig. 4.6）、ミトコンドリア内の過剰なスーパーオキシドが関与するアポトーシス活性化経路が存在し、この経路に関与している可能性は捨てきれない。

### SOD2 はゲノム安定性維持に顕著な影響を及ぼさない

*SOD2* が何らかの形でゲノム安定性維持に関与しているかどうか検討するために、*SOD2* 条件破壊株から *SOD2* の発現を停止後に、DNA 傷害剤に対する感受性を観察したところ、野生株とはほぼ同程度の感受性を示した（Fig. 4.8）。また、DNA 傷害の指標として、DNA 変異試験にも使用されている姉妹染色分体交換をドキシサイクリン添加後 5 日目の *SOD2* 条件破壊株を用いて測定した結果、その頻度は野生株とはほぼ同程度であることが分かった（Fig. 4.9）。この結果から、*SOD2*、または *SOD2* 欠損によって発生すると考えられる酸化ストレスがゲノム安定性維持に顕著な影響を与えている可能性は低いと考えられた。一方、当研究室の井上によって作製された DT40 *SOD1* 条件破壊株は、*SOD1* の発現量減少と共に SCE 頻度が上昇し、更に発現が停止すると染色体異常が観察された（井上 未発表データ）。また、出芽酵母においても *sod1* 破壊株の unequal-SCR（sister chromatid recombination）が上昇することが明らかになっているが、*sod2* 破壊株では野生株と同程度だった（高田卒論）。逆に、*Sod2* ノックアウト由来繊維芽細胞（MEF）は顕著な染色体異常が生じていることが報告されている（Samper *et al.*, 2003）が、*Sod1* ノックアウトマウスではそのような報告はなく、全体的な表現型も *Sod2* に比べて弱い。このように、*SOD1* が優位に機能している種と *SOD2* が優位に機能している種が存在すると考えられる。本研究および、DT40 *SOD1* 条件破壊株の結果から DT40 細胞では、ゲノム安定性維持に関与するのは主

に SOD1 であり、SOD2 の貢献度は比較的低いと考えられる。

### SOD2 は細胞周期の進行に関与する

SOD2 発現停止による細胞増殖能の低下の原因を探るため、細胞周期の分布を解析したところ、G1 期の細胞数が増加していた(Fig. 4-11)。更に、G1 期に同調後、細胞周期を進行させたところ、G1 期から S 期への進行に遅れが観察された(Fig. 4-12, 4-13)。この結果は、出芽酵母において *sod2* 破壊株の G1 期が延長されること、また、HeLa 細胞において、細胞が増殖した結果通常なら増殖が停止して G1 期に蓄積するような条件でも、SOD2 を過剰発現させると細胞増殖能を保つことができるという報告と符合するものである(Sarsour *et al.*, 2005)。

また、SOD2 発現停止によって S 期の進行自体にも遅延が観察された(Fig. 4-12, 4-13)。この結果から、

- ① SOD2 発現停止によって生じた酸化ストレスが DNA に SCE を起こさせないような傷害を加えた、または DNA 複製に影響があり、DNA 複製チェックポイントが発動した。
- ② SOD2 発現停止によって生じた酸化ストレスによって、DNA 複製の進行速度自体が低下した。
- ③ SOD2 発現停止によって、何らかの理由で細胞周期を進行させるサイクリンや CDK (cyclin dependent kinase) の不活化 (サイクリンの 1 つである cyclin D1 は酸化ストレスによって発現量が減少すると考えられている) が起こってしまい、複製開始が起こりにくくなっている。

以上の仮説が考えられた。しかしながら、SOD2 発現停止後に DNA 複製チェックポイントの活性化に関与する CHK-1 の Ser345 のリン酸化が観察されることはなく(Fig. 4-14)、①の仮説を立証するような証拠は得られなかった。また、DNA fiber 法によって DNA 複製フォークの進行速度を測定したところ、SOD2 の発現を停止させても、ほとんど差は観察されなかった(Fig. 4-15)。そのため、②の仮説も否定される。最後に、③の仮説であるが、これを証明することは困難では

あるが、G<sub>1</sub>期からS期への移行も遅延していることから、G<sub>1</sub>/S期移行に関与するサイクリンやCDK (cyclin A、D、E や Cdk2、4、6)の活性化が妨げられている可能性が高いと考えられる。SOD2の枯渇がDNA複製阻害剤であるHUやaphidicolineに対して耐性を示す理由も(Fig. 4-10)、複製開始が起きにくくなり、DNA複製フォークが形成される数が少なくなることで、HUやaphidicolineによるDNA複製フォークの崩壊が起きにくくなったためではないかと推測できる。

また最近、HeLa細胞に、抗酸化物質でありまた酸化促進物質でもあるN-acetyl cysteineを処理したところ、スーパーオキシドの増加と共にG<sub>1</sub>期に停止し、その原因がcyclin D1の減少によるものであることが報告された(Menon *et al.*, 2007)。さらに、このcyclin D1は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激によってその分解が抑制されること、生存促進因子AKTもH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激によって活性化されることが知られている(Murata *et al.*, 2003)。このAKTは、cyclin D1の分解を促進するglycogen synthase kinase-3βと呼ばれるキナーゼを抑制することが知られている(Diehl *et al.*, 1998)。また、このcyclin D1やAKTが活性化するG<sub>1</sub>期には、SOD2の活性が最も高くなることが報告されている(Oberley *et al.*, 1995)。以上のことからSOD2がスーパーオキシドの除去だけでなく、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成を介して、G<sub>1</sub>期からS期への移行やS期の進行を促進していることが考えられる。つまり、本研究でSOD2の枯渇が誘発した表現型は、酸化ストレスを発生だけでなく、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の減少が、cyclin D1の活性化を減弱させたためである可能性が考えられる。この仮説を証明するためには、SOD2枯渇がH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を減少させ、cyclin D1の発現量低下を引き起こすかを検証しなければならないが、残念ながらニワトリのcyclin D1を認識する抗体が存在せず、現時点ではDT40の系での証明は困難である。しかしながら、本研究で作製したSOD2条件破壊株の表現型が他の高等真核生物由来SOD2破壊株よりもマイルドであることが幸いし、本研究によりSOD2によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成が細胞増殖を促進する可能性が初めて示された。

## 最後に

本研究では、SOD2 を tet-off system によって枯渇させることで、SOD2 欠損による細胞周期進行への影響など複数の表現型を得ることができた。しかしながら、当初の目的であった SOD2 機能欠損がゲノム安定維持に及ぼす影響を明確にすることはできなかった。現在、当研究室で *SOD1*、*PRDX1* 条件破壊株を用いた解析が行われており、今後、このプロジェクトの進行の発展を期待するとともに、SOD2 のゲノム安定性維持や細胞機能の維持における役割が明確になっていくことを期待する。

## 第 6 章 実験材料および方法

### 第 1 節 細胞培養

#### 1.1 使用株

本研究で使用した DT40 細胞株を以下に示した。

Wild-type

*SOD2<sup>-/-</sup>/hSOD2-HA* (neo/ecogpt/hyg)

#### 1.2 培地及び試薬

##### (1) RPMI 培地

RPMI#1640 培地 (日水製薬) 10.2 g、HEPES (同仁化学研究所) 2.4 g、ピルビン酸ナトリウム (WAKO) 0.1 g を脱イオン水 1 L に溶解し、高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 min) して 4°C で保存した。使用時には 10 % NaHCO<sub>3</sub> で pH 7.2 になるように調整し、さらに最終濃度 2 mM L(+)-グルタミン (WAKO)、10 % 非動化済みの牛胎仔血清と 1 % 非動化済みのニワトリ血清、0.1 g/L 硫酸カナマイシン (明治製菓) になるように培地を調整した。

##### (2) 10 % NaHCO<sub>3</sub>

10 % NaHCO<sub>3</sub> (WAKO) 10 g を脱イオン水 100 mL に懸濁し高圧蒸気滅菌した。

##### (3) L(+)-グルタミン

2.94 g の L(+)-グルタミン (WAKO) を生理食塩水に溶かし、ろ過滅菌した。

##### (4) 牛胎仔血清 (fetal calf serum ; FCS)

Flow 社製または Bioserum 社製のものを 56°C で 30 min 非動化した後、4°C で保存した。

(5) ニワトリ血清 (chicken serum ; CS)

Sigma 社製のものを FCS と同様に非動化し、4℃で保存した。

(6) PBS (phosphate-buffered saline)

NaCl (WAKO) 8.0 g、CaCl<sub>2</sub> (WAKO) 0.2 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (WAKO) 2.9 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (WAKO) 0.2 g を脱イオン水 1 L に融解した。

(7) メチルセルロース培地

216 mL MilliQ 水と 7.5 g メチルセルロース (Fluka) をそれぞれ 500 mL のメ  
ディウム瓶に入れ、高圧蒸気滅菌した。それぞれ熱いうちに、MilliQ 水をメチ  
ルセルロースの入った瓶に加え、素早く良く攪拌した。50℃程度まで冷めたら 2  
×DMEM/F-12 培地(Gibco) を 216 mL 加え、4℃で一晩攪拌した。翌日 75 mL 非  
動化済み FCS と 7.5 mL 非動化済み CS を加え、4℃で保存した。

(8) 2×DMEM/F-12 培地

1 L 分の 2×DMEM/F-12 (Gibco)および、NaHCO<sub>3</sub> (WAKO) 1.2 g を 500 mL の脱  
イオン水に融解し、濾過滅菌した後、4℃で保存した。

## 第 2 節 ターゲッティングベクターの作成

### 2.1 DT40 細胞からのゲノム DNA の抽出

#### 2.1.1 材料および試薬

(1) Easy-DNA™ kit (invitrogen)

(2) PBS

(3) ethanol (WAKO)

(4) chloroform (ナカライ)

### 2.1.2 実験方法

約  $1 \times 10^7$  の細胞を回収し、200  $\mu$  L の PBS に懸濁した。その後、350  $\mu$  L の solution A を加え、65  $^{\circ}$ C で 10 分過熱した。その後、150  $\mu$  L の solution B と 500  $\mu$  L の chloloroform を加え、攪拌し、14,000 rpm で 20 min、遠心した。生成した上清 500  $\mu$  L に 100% ethanol を 800  $\mu$  L 加え、30 min、氷上で静置した。14,000 rpm で 15 min 遠心し、沈澱したゲノム DNA を 80% ethanol で洗浄した。ゲノム DNA を乾燥させた後、RNase 入りの 100  $\mu$  L TE に溶解させた。

## 2.2 PCR による chicken *SOD2* の genomic DNA クローニング

### 2.2.1 材料および試薬

(1) LA Taq PCR Kit ; 10 $\times$ LA PCR buffer、25 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 mM dNTP、LA Taq polymerase (TaKaRa) Advantage GC2-PCR Kit ; GC-Melt

(2) 使用したプライマ-

Primer name	Oligonucleotide
ch-SOD2 fw2	AAGCAGGGCTGCGCTGGTAGCACCG
ch-SOD2 rv2	TCCATCTACTTTCTGCAAGATTCATATCTTGAAG

(3) PCR プログラム

94  $^{\circ}$ C 2 min、(94  $^{\circ}$ C 30 sec、58 $^{\circ}$ C 30 sec、72 $^{\circ}$ C 6 min ) $\times$ 35、72 $^{\circ}$ C 5 min、12 $^{\circ}$ C forever



## 2.2 実験方法

データベース上のニワトリゲノム配列に基づき、gene-specific primer を用いて DT40 ゲノム DNA を鋳型とし、longer-PCR を行った。アガロースゲルに電気泳動し、約 6 kbp のバンドを回収して、pGEM-T easy vector (Promega) に組み込み、プラスミド DNA を調製し、塩基配列を確認した。

## 2.3 薬剤耐性マーカー遺伝子挿入用 *Bam*H I site の導入

### 2.3.1 材料および試薬

(1) LA Taq PCR Kit (同上)

(2) 使用した primer

L arm 用

Primer name	Oligonucleotide
ch-SOD2 fw2	AAGCAGGGCTGCGCTGGTAGCACCG
SOD2 rv41016	GGATCCCCTGAGGATGCAGAAGATAAATAAATAG
BamH1	

R arm 用

Primer name	Oligonucleotide
SOD2fw4258	GGATCCGCTTATGAGTGCTCATTGGG
BamH1	
ch-SOD2 rv2	TCCATCTACTTTCTGCAAGATTCATATCTTGAAG

### (3) PCR プログラム

L arm、R arm 用共に、

94 °C 2 min、(94 °C 30 sec、56°C 30 sec、72°C 3 min )×30、72°C 10 min

### 2.3.2 実験方法

2.2 で作成した vector を template としてそれぞれ上記の primer を用いて PCR を行い、得られた band を回収して、pGEM-T easy vector (Promega) に組み込み、プラスミド DNA を調節して、シーケンス解析を行った。得られた 2 つのプラスミド DNA を、それぞれ *BamH* I と *Nde* I で処理し、両者を ligation させた。

## 2.4 ターゲッティングベクターの作成

### 2.4.1 材料および試薬

(1) 2.3 で作成した vector

(2) マーカー (ニワトリ  $\beta$ -actin promoter 下流に histidinol、blastidin、puromycin、ecogpt、hygromycin、neomycin、bleomycin 耐性遺伝子を組み込んだもの)

## 2.5 chicken SOD2 ターゲッティングベクターの作成

作成した vector を *BamH* I で処理し、各マーカーを挿入した。

## 2.6 DNA シーケンス解析

DNA の塩基配列を確認するため、Sanger らの dideoxy 法に従い、以下の手順で DNA シーケンスを行った。Taq DyeDeoxy<sup>TM</sup>Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて行った。プレミックスとして、5×TACS buffer、dNTP mixture、DyeDeoxy<sup>TM</sup>Terminators、および Ampli Taq を混和し、これに鋳型 DNA 0.25  $\mu$ g、primer 1.6 Pmol を加えて全量を 10  $\mu$ L とし、Thermal Cycler で以下の反応を行った。反応終了後、ethanol 沈澱により DNA を回収、loading buffer (TSR ; template suppression reagent) に溶解した。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) にサンプルをセットして、既存のプログラムによりキャピラリー電気泳動を行い、蛍光色素を読み取った後、データ解析を行った。

## 第 3 節 human SOD2 Tet-off system 導入用ベクターの作製

### 3.1 HeLa 細胞の total RNA の抽出

#### 3.1.1 材料および試薬

##### (1) TRIzol Reagent (Gibco BLK)

#### 3.1.2 実験方法

氷冷 PBS で洗浄した  $5 \sim 10 \times 10^6$  の細胞のペレットに TRIzol Reagent 1 mL を加えて可溶化し、室温で 5 min 静置する。200  $\mu$ L の chloroform を加えよく混和し、室温で 3 min 静置後、14,000 rpm、4°C で 15 min 遠心した。その上清に 2-propanol (WAKO) を 500  $\mu$ L 加え混和し、10 min 室温に静置後、14,000 rpm、4°C で 10 min 遠心し、沈降した RNA を 75% ethanol で洗浄した。RNA ペレットを風乾し、DEPC 処理 MilliQ 水に溶解した。濃度測定後、-80 °C で保存した。

### 3.2 RT-PCR

#### 3.2.1 材料および試薬

(1) Super Script III; oligo dT primer、10 mM dNTPs、5×first strand buffer、0.1 M DTT、

Super Script III RT、RNase OUT、RNase H (Invitrogen)

(2) Phusion High-Fidelity DNA Polymerase: 5×Phusion HF Buffer、2 mM each

dNTPs、Phusion DNA polymerase (NEW ENGLAND Bio Labs)

(3) 使用プライマー

Primer name	Oligonucleotide
hSOD2 fw1	ATGTTGAGCCGGGCAGTGTGCGG
hSOD2 rv669	CTACTTTTTTGCAAGCCATGTATCTTTC

(4) PCR プログラム

94 °C 2 min、(94 °C 30 sec、50°C 30 sec、68°C 1 min)×30、72°C 5min

#### 3.2.2 実験方法

細胞から抽出した 5  $\mu$ g の total RNA に DEPC 処理した MilliQ 水を加えて全量を 11  $\mu$ L にし、1  $\mu$ L の oligo (dT) primer、5×buffer、1  $\mu$ L の 10 mM dNTPs を加え、65 °C で 5min 反応させ、氷上で 1 min 以上冷却する。4  $\mu$ L の 5×first strand buffer、1  $\mu$ L の 0.1 M DTT、1  $\mu$ L の RNase OUT、1  $\mu$ L の Super Script III RT を加え、25°C で 5 min、50°C で 1 hr、70°C で 15min 反応させ、再び氷上で冷却する。1  $\mu$ L の RNase H を加え、37°C で 20 min 処理し、得られた cDNA を鋳型として、上記のプライマー、program で PCR を行った。

### 3.3 A-付加

#### 3.3.1 材料および試薬

(1) 2 mM dATP (TaKaRa)

(2) Taq polymerase (TaKaRa)

#### 3.3.2 実験方法

3.2.2 で得られた PCR 産物を 95°C で 20 min 反応させた後、2 mM dATP を 9  $\mu$  L、Taq polymerase を 1  $\mu$  L 加えて、70°C で 15 min 反応させた。

### 3.4 PCR による human SOD2 の cDNA クローニング

PCR 産物をアガロース電気泳動により展開した後、約 500 bp のバンドを回収して、pGEM-T easy vector (Promega) に組み込み、プラスミド DNA を調製し、シーケンス解析を行った。

### 3.5 制限酵素サイトおよび HA 配列の付加

#### 3.5.1 材料および試薬

(1) LA PCR kit (同上)

(2) 使用プライマー

Primer name	Oligonucleotide
sac II - hSOD2-fw1	GAACCGCGGATGTTGAGCCGGGCAGTGTGCGGCA
Xba I -HA- hSOD2-rv1	CTTTCTAGACTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTACTTTTTGCA AGCCATGTATCTT

### (3)PCR プログラム

94 °C 3min、(94 °C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 1 min )×35、72°C 4min

#### 3.5.2 実験方法

1.4 で作成した vector を template としてそれぞれ上記の primer を用いて PCR を行い、得られた band を回収して、pGEM-T easy vector (Promega) に組み込み、プラスミド DNA を調節して、シーケンス解析を行い、hSOD2 の 3 ‘末端に *Xba* I サイト、5 ‘末端に *Sac* II サイトおよび HA 配列が付加されていることを確認した。

#### 3.6 hSOD2-HA/tet-off ベクターの作製

2.5 で作製した vector および 1-118 vector を *Xba* I および *Sac* II で制限酵素処理して、組み込み、プラスミド DNA を調節して、シーケンス解析を行った。

## 第 4 節 DT40 細胞へのトランスフェクション

### 4.1 使用薬剤濃度

選択マーカー	使用薬剤銘柄	ストック溶液	終濃度
Hygromycin ; Hyg	Hygromycin B (WAKO)	250 mg/mL in Ster. MilliQ	2.5 mg/mL
Ecogpt ; Eco	Mycophenoic acid (WAKO)	10 mg/mL in DMSO	20 μg/mL
Neomycin ; Neo	Geneticin disulfate (WAKO)	200 mg/mL in Ster. MilliQ	2.0 mg/mL

### 4.2 実験方法

約  $1 \times 10^7$  の細胞を 1,000 rpm、5 min、4°C で遠心して回収後、1.0 mL の PBS で細胞を洗った。次に予め、直鎖化した 30 μg のターゲッティングベクターを溶解

させた 0.5 mL の PBS に細胞を懸濁した。氷上に 10 min 静置後、Gene pulser II apparatus (Bio Rad、Hercules、CA)を用い、550 V、25  $\mu$ F で細胞をエレクトロポレーション後、氷上に 10 min 静置した。細胞を 20 mL の RPMI 培地で 24 hr、39°C で培養後、細胞を遠心回収し、各薬剤を含む 100 mL の RPMI 培地に再懸濁し、5 枚の 96 well プレートに播いた。1 週間程度 39°C で培養した後生じる薬剤耐性コロニーを 24 well プレートに移し、培養した。

## 第 5 節 PCR 法による遺伝子破壊の確認

### 5.1 DT40 細胞からのゲノム DNA の抽出

#### 5.1.1 材料および試薬

(1) Easy-DNA™Kit ;solution A、solution B、TE buffer、2 mg/mL RNase (Invitrogen)

#### 5.1.2 実験方法

24 well プレートで増殖させた DT40 細胞を遠心回収し、ペレットを PBS によく懸濁する。Solution A を加えて強く攪拌し、65°C で保温の後、Solution B を加えて更に攪拌する。chloroform (WAKO)を加えてよく攪拌し、14,000 rpm、4°C で 15 min 遠心し、上清をの 95 % ethanol とよく混ぜ、氷上にて 30 min 静置する。14,000 rpm、4°C で 15 min 遠心し、ペレットをの 70% ethanol で洗い、風乾の後、の TE (20  $\mu$ g/mL RNase)で溶解し、37°C で 30 min インキュベートすることで、ゲノム DNA の回収を行った。

### 5.2 PCR による遺伝子破壊の確認

#### (1) 使用プライマー

Primer name	Oligonucleotide
Neo	CGCATCGCCTTCTATCGCCTTC
ch-SOD2-391 fw	ACGGCGCAAGAACGTGGGTTAG
ch-SOD2-3028fw	GGTGTGCTACTGCTTCATGTCTGTCCTGAG
Ch-SOD2-4072rv	CTTCCCCAGGAATGCCATCTGATATACACC

(2) PCR プログラム

	Allele disruption check ch-SOD2-391fw&NEO	KO check ch-SOD2-3028fw & ch-SOD2-4071rv
Step 1	94°C 3 min	94°C 3 min
Step 2	94°C 30 sec	94°C 30 sec
Step 3	58°C 30sec	59°C 30sec
Step 4	72°C 4min	72°C 1min
Step 5	(step 2〜4)×35 cycles	(step 2〜4)×35 cycles
Step6	72°C 5min	72°C 5min



## 第 6 節 RT-PCR による遺伝子破壊の確認

### 6.1 DT40 細胞からの total RNA の抽出

#### 6.1.1 材料および試薬

##### (1) TRIzol Reagent (Gibco BLK)

#### 6.1.2 実験方法

氷冷 PBS で洗浄した  $5\sim 10 \times 10^6$  の細胞のペレットに TRIzol Reagent 1 mL を加えて可溶化し、室温で 5 min 静置する。200  $\mu$  L の chloroform を加えよく混和し、室温で 3 min 静置後、14,000 rpm、4℃で 15 min 遠心した。その上清に 2-propanol (WAKO)を 500  $\mu$  L 加え混和し、10 min 室温に静置後、14,000 rpm、4℃で 10min 遠心し、沈降した RNA を 75% ethanol で洗浄した。RNA ペレットを風乾し、DEPC 処理 MilliQ 水に溶解した。濃度測定後、-80 °Cで保存した。

### 6.2 RT-PCR

#### 6.2.1 材料および試薬

- (1) ReverTra Ace: ReverTra Ace、oligo (dT) primer、5×buffer、10 mM dNTPs (TOYOBO)
- (2) PCR kit (同上)
- (3) 使用プライマー

Primer name	Oligonucleotide
S2 fw	ATGTTGTGCCGCTGGCGTC
S2 rv	CTTTCTGCAAGATTCATATCTTTGAGACACGT
52 f 354	CGGCTCATACCATGAAGATGTGGGC
52 r 1101	CCTGTTACGAGTTGTCATCTGGTGACG

#### (4) PCR プログラム

	SOD2	RAD52
	S2 fw&S2 rv	52 f 354&52 rv1101
Step 1	94°C 2 min	94°C 2 min
Step 2	94°C 30 sec	94°C 30 sec
Step 3	56°C 30sec	63°C 30sec
Step 4	72°C 1min	72°C 1min
Step 5	(step 2〜4)×25 cycles	(step 2〜4)×25 cycles
Step6	72°C 3min	72°C 3min

#### 6.1.3実験方法

細胞から抽出した 2.5  $\mu$ g の total RNA に DEPC 処理した MilliQ 水を加えて全量を 6  $\mu$ L にし、2  $\mu$ L の oligo (dT) primer、5 $\times$ buffer、1  $\mu$ L の 10 mM dNTPs、0.5  $\mu$ L の ReverTra Ace を加え、30  $^{\circ}$ C で 10 min、42  $^{\circ}$ C で 30 min 反応させ、99  $^{\circ}$ C、5 min の処理で ReverTra Ace を失活させた。得られた cDNA を鋳型として、上記のプライマー、program で PCR を行った。

## 第 7 節 サザンブロットによる遺伝子破壊の確認

### 7.1 DNA プローブの RI 標識

#### 7.1.1 材料および試薬

- (1) Rediprimer Kit (Amersham Pharmacia)
- (2) Spin-column G50 (Boehringer)
- (3) [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham Pharmacia)
- (4) PCR Kit (同上)
- (5) プローブ ; ゲノム DNA を template として用いて、以下の PCR より得た。

Primer name	Oligonucleotide
ch-SOD2-pr-fw3	TATGAGATCTTAATGTGCTGTAGCAG
ch-SOD2-pr-rv3	CTTCTGTAATACCAGACAGTACTTC

#### (6) PCR プログラム

94 °C 2 min、(94 °C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 1 min) × 35、72°C 5 min

#### 7.1.2 実験方法

Gene Clean II (Q-Bio Gene)で回収したゲノム DNA 断片 25 ng を TE 45  $\mu$  L に溶解した。100 °C で 5 min 加熱した後、氷中に急冷した DNA を Rediprime Kit の labeling mix tube に入れ、内容物を溶液中に溶解した。さらに、5  $\mu$  L の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (1 mCi/mL)を加え、37 °C で 30 min インキュベートした。EDTA を加えて反応を停止させた後、保存液を遠心除去した Spin-column G50 に移し、3,000 rpm で 3 min 遠心することにより、放射標識したプローブ溶液を得た。プローブ溶液は使用直前に 100 °C で 10 min 加熱し氷冷した後使用した。

## 7.2 サザンハイブリダイゼーション

### 7.2.1 試薬および試薬

- (1) Easy-DNA™Kit ; solution A、solution B、TE buffer、2 mg/mL Rnase (invitrogen)
- (2) Denaturing buffer ; .25 M HCl
- (3) Neutralizing buffer ; 1.5 M NaCl、0.5 M NaOH
- (4) 20×SSC ; 3 M NaCl、0.5 M Na<sub>3</sub>-Citrate (pH7.0)
- (5) 20×SSPE ; 3 M NaCl、0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O、0.02 M EDTA(pH7.4)
- (6) 50×Denhalt`s solution ; 1% Ficoll (nacakai)、1% polyvinylpyrrolidone (P-5288) (SIGMA)、1% BSA (SIGMA)、5.0 g の Ficoll、5.0 g の polyvinylpyrrolidone、5.0 g の BSA を 500 mL の脱イオン水に溶解した。
- (7) 10 mg/mL salmon sperm DNA (ssDNA)  
  
サケ精子 DNA を約 10 mg/mL になるように TE に溶解し、粘度が低下するまで超音波処理を行った。さらに phenol/chloroform 抽出後、ethanol 沈澱し、終濃度 10 mg/mL になるように TE に溶解した。使用直前に 100℃で 10 min 加熱し、氷冷したものを用いた。
- (8) prehybridization buffer ; 5×SSC、1×Denhalt`s solution、2 % SDS (WAKO)、2 % SDS (WAKO)、50 % formamide (ナカライ)、0.1 mg/mL salmon sperm DNA
- (9) hybridization buffer ; 5×SSC、1×Denhalt`s solution、2% SDS (WAKO)、50% formamide (ナカライ)、0.1 mg/mL salmon sperm DNA、50 μL [α-<sup>32</sup>P] dCTP probe DNA
- (10) wash solution 1 ; 2×SSC、0.05% SDS
- (11) wash solution 2 ; 0.1×SSC、0.05% SDS

## (12) Hybond N (Amersham Pharmacia)

### 7.2.2 実験方法

#### (1) membrane の作成

PCR check で陽性を示したクローンにつき  $10^7$  程度の細胞を回収し、ペレットを  $40 \mu\text{L}$  の PBS によく懸濁する。 $70 \mu\text{L}$  solution A を加えて強く攪拌し、 $65^\circ\text{C}$ 、10min で保温の後、 $30 \mu\text{L}$  solution B を加えてさらに攪拌する。 $100 \mu\text{L}$  chloroform (WAKO) を加えよく攪拌し、 $14,000 \text{ rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$  で 15 min 遠心し、上清を  $250 \mu\text{L}$  の 95 % ethanol とよく混ぜ、氷上にて 30 min 静置する。 $14,000 \text{ rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$  で 15 min 遠心し、ペレットを  $200 \mu\text{L}$  の 70% EtOH で洗い、風乾の後、 $20 \mu\text{L}$  の TE( $20 \mu\text{g/mL}$  の RNase を含む)に溶解し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 min インキュベートすることでゲノム DNA の回収を行った。各サンプルにつき  $40 \mu\text{g}$  のゲノム DNA を一晩かけて制限酵素処理を行った。ethanol 処理し、 $20 \mu\text{L}$  の TE に溶解させた制限酵素処理ゲノム DNA をサンプルとして 1% agarose gel (SeaKem<sup>®</sup>GTGR agarose BMA)と  $1\times$  TAE buffer を用いて 30 V、16.5 hr 電気泳動を行った。EtBr 染色を行った後、ゲルを Denaturing buffer に入れ、BPB マーカースの色が黄緑色に変化してから更に 20 min 震盪させた。更に、水道水でゲルを洗浄した後、Neutralizing buffer に入れ 30 min 震盪した。軽石に  $20\times$  SSC をしみこませた transfer 容器を用意し、3 MM paper を軽石の上に載せ、 $20\times$  SSC を十分しみこませた後、泳動済みのゲル、Hybond N membrane、 $5\times$  SSC、に浸した 3 MM paper、20 cm の高さのキムタオルを順次乗せてから、一晩放置することで泳動された DNA を Hybond N membrane を  $5\times$  SSC ですすいだのち、3 MM paper に挟んで乾燥させたものを  $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

## (2) hybridization

DNA をトランスファーした membrane を  $2\times\text{SSC}$  に浸した後、 $42^{\circ}\text{C}$  の prehybridization buffer に浸し、2 hr 震盪しながらインキュベーションした。次にプローブ溶液を入れた hybridization buffer で  $42^{\circ}\text{C}$ 、一晩震盪しながらインキュベートした。Wash solution 1 に membrane を移し、 $42^{\circ}\text{C}$  で 5 min  $\times$  3 回繰り返して洗浄した後、Wash solution 2 で同様の操作を行った。得られた membrane を濾紙に貼り付け、オートグラフィーによって目的とする DNA のバンドを検出した。

## 第 8 節 細胞増殖曲線

### 8.1 材料および試薬

#### (1) 0.5 % Trypan blue

0.5 g の Trypan Blue (東京化成) を 100 mL の脱イオン水に加え、よく攪拌して溶かした後、Millipore フィルターで濾過したものを用了。

### 8.2 実験方法

$1.0\times 10^4$  の細胞を 1 mL の RPMI で培養し、0.5 % Trypan blue を培地の 1/25 量加えて死細胞を染色した。Trypan blue で染色されない細胞のみを 2 day ごとに計測した。

## 第 9 節 薬剤感受性試験

### 9.1 材料および試薬

- (1) メチルセルロース培地
- (2) Metyl methanesulfonate (MMS ) (Aldrich)
- (3) 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO) (Sigma)
- (4) Hydroxyurea (Sigma)
- (5) Aphidicoline (Sigma)

### 9.2 実験方法

各濃度の薬剤を含んだ 1.5 %メチルセルロース培地中に、細胞を 400 cells/dish となるように細胞を加え、十分攪拌し、6 cm シャーレに播いた。7ー14 日後に生えてきた細胞コロニー数を数えた。

## 第 10 節 DNA-Ladder の検出

### 10.1 材料および試薬

- (1) Easy-DNA™ Kit ; solution A、solution B、TE buffer、2 mg/mL RNase (invitrogen)

### 10.2 実験方法

6 well plate、もしくは 6 cm シャーレ中で薬物処理した細胞を遠心回収し、ペレットを 40  $\mu$  L の PBS に懸濁した。70  $\mu$  L solution A を加え vortex した後、65°C で 10 min、incubate し、30  $\mu$  L solution B を加えてさらに攪拌した。100  $\mu$  L chloroform を加えよく攪拌し、14,000 rpm、4°C で 15 min 遠心し、上清を 200  $\mu$

L の 95 % ethanol とよく混ぜ、氷上にて 30 min 静置する。14,000 rpm、4°C で 15 min 遠心し、ペレットを 200  $\mu$  L の 70% ethanol で洗い、風乾の後、50  $\mu$  L の TE(20  $\mu$  g/mL の RNase を含む)で溶解し、37°C で 30 min インキュベートした。得られたゲノム DNA の濃度を測定して調節し、1 well あたり 4  $\mu$  g の DNA を 2 % agarose gel で 100 V、30 min 泳動した。ゲルを 0.5 mg/mL EtBr で染色し、UV イルミネーターで撮影を行った。

## 第 11 節 Flowcytometry による解析

### 11.1 PI 単染色による細胞周期分布の解析

#### 11.1.1 材料および試薬

(1) Cycle TEST<sup>TM</sup>PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickson)

#### 11.1.2 実験方法

$1.0 \times 10^6$  の細胞を 900  $\mu$  L の buffer solution に懸濁し、3,000 rpm、4°C で 3min 遠心し、ペレットを 900  $\mu$  L の buffer solution に再懸濁し、液体窒素で瞬間凍結し、80°C でサンプルを保存した。37°C の水浴で解凍し、3,000 rpm、4°C で 3min 遠心し、ペレットに 125  $\mu$  L の solution A を加えて室温で 10 min 放置し、次に 100  $\mu$  L の solution B を加え、室温で 10 min 放置する。最後に、100  $\mu$  L の solution C を加えて、遮光し 10 min 氷冷した。そして、filtration 後、FACScan (Becton Dickson、Mountain view、CA) で測定し、Cell Quest (Beccton Dickinson) ソフトウェアで解析した。



## 11.2 BrdU と 7-AAD の二重染色による細胞周期分布の解析

### 11.2.1 材料および試薬

(1) BD pharmingen™BrdU Flow Kits (BD Biosciences)

(2) 1×DPBS

0.2 g の KCl、0.2 g の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、8.0 g の NaCl、2.16 g の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を 1 L の MilliQ に溶解 (pH7.2〜7.4) し、高圧蒸気滅菌した。

(3) Perm/Wash buffer

10×Perm/Wash buffer を ster.MilliQ で 10 倍希釈した。

(4) Staining buffer

1×DPBS に最終濃度 3 %になるように FCS および 0.1 % (W/v) sodium azide を加えた。

### 11.2.2 実験方法

$1.5 \times 10^6$  の細胞を 10  $\mu\text{M}$  の BrdU で 15 min ラベルし、1,000 rpm、5 min で遠心回収した。1 mL の Staining buffer で洗い、100  $\mu\text{L}$  の Cytofix/Cytoperm buffer に懸濁し、30 min 氷上で静置した。1 mL の Perm/Wash buffer で洗い、100  $\mu\text{L}$  の Cytoperm plus buffer に懸濁し、10 min 氷上で静置した。再び 1 mL の Perm/Wash buffer で洗い、100  $\mu\text{L}$  の Cytofix/Cytoperm buffer に懸濁し、5 min 氷上で静置した。1 mL の Perm/Wash buffer で洗い、100  $\mu\text{L}$  の DNase (0.3 mg/mL in DPBS) に懸濁し、37 °C で 1 hr インキュベートした。1 mL の Perm/Wash buffer で洗い、50  $\mu\text{L}$  の FITC- $\alpha$ -BrdU in Perm/Wash buffer を加えて、遮光しながら 20 min 室温に放置した。1 mL の Perm/Wash buffer で洗い、20  $\mu\text{L}$  の 7-amino actinomycin D (7-AAD) に懸濁し、1 mL の Staining buffer を加えてろ過したものを FACScan に

かけた。

### 11.3 PI と Annexin V の二重染色による初期アポトーシスの検出

#### 11.3.1 材料および試薬

(1) Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #3 ; 5×Annexin-Binding buffer、FITC annexin V 、 10 mg/ mL PI (Molecular Probes)

(2) 1×Annexin-Binding buffer

5×Annexin-Binding buffer を ster..milliQ で希釈した。

(3) 100  $\mu$  g/mL PI

10 mg/ mL PI を 1×Annexin-Binding buffer で希釈した。

#### 11.3.2 実験方法

1×10<sup>6</sup> の細胞を氷冷した PBS で洗浄する。ペレットに 100  $\mu$  L の 1×Annexin-Binding buffer を加え、十分にピペッティングする。5  $\mu$  L の FITC annexin V と 1  $\mu$  L の PI (100  $\mu$  g/mL ) を加え、室温で 15 min 放置し、氷上に移す。更に 400  $\mu$  L の 1×Annexin-Binding buffer を加え、ナイロンメッシュを通して FACSscan (Becton Dickson、Mountain view、CA) で測定し、Cell Quest (Beccton Dickinson) ソフトウェアで解析した。

## 第 12 節 染色体異常の検出

### 12.1 姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange ; SCE) の観察

#### 12.1.1 材料および試薬

(1) コルセミド (デメコルシン溶液) (WAKO)

(2) 75 mM KCl

2.87 g の KCl (WAKO) を MilliQ 水 500 mL に溶解し、室温に保存した。

(3) カレノア固定液

3 : 1 の割合で methanol (ナカライ) と酢酸 (ナカライ) を使用する直前に混合し、用いた。

(4) 1 mg/mL Hoechst 33258

5 mg の Hoechst 33258 を MilliQ 水 5 mL に溶解し、4 °C で遮光して保存した。

(5) 2×MacILvaine buffer (2×MB)

58.9 g の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (ナカライ) と 3.38 g のクエン酸一水和物 (WAKO) を適量の脱イオン水に溶解し、pH を 7.0 以上にした後、500 mL にメスアップし、室温で保存した。

(6) 20×SSC

87.65 g の NaCl (ナカライ) と 44.1 g のクエン酸三ナトリウム二水和物 (ナカライ) を適量の脱イオン水に溶解し、pH 7.0 にあわせた。500 mL にメスアップした後、高圧蒸気滅菌をし、室温で保存した

(7) 10×Phosphate buffer (10×PB)

11.34 g の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (ナカライ) と 56.69 g の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (ナカライ) を適量の脱イオン水に溶解し、pH を 6.8 にあわせた。500 mL にメスアップした後、高圧蒸気滅菌をし、室温で保存した。

(8) 3 % ギムザ溶液

Giemsa's solution (MERCK) 原液を 1×PB に希釈して用いた。

(9) カナダバルサム (WAKO)

### 12.1.2 実験方法

$5 \times 10^5$  細胞を  $10 \mu\text{M}$  BrdU を含む  $5 \text{ mL}$  の RPMI 培地で 2 細胞周期 ( $16.5 \text{ hr}$ ) 培養し、コルセミドを  $50 \mu\text{L}$  加え、更に  $2.5 \text{ hr}$  培養した。その後、細胞を遠心し、ペレットに  $75 \text{ mM KCl}$  を  $10 \text{ mL}$  加えてよく懸濁しさせ  $12 \text{ min}$  室温で静置した。カレノア固定液を  $2 \text{ mL}$  加えてよく混合させ、 $1,000 \text{ rpm}$  で  $5 \text{ min}$  遠心し、ペレットにまたカレノア固定液を  $10 \text{ mL}$  加え、懸濁させて  $30 \text{ min}$ 、室温で放置した。その後、2 回  $10 \text{ mL}$  のカレノア固定液で細胞を洗浄し、最後に、ペレットを数滴のカレノア固定液に懸濁した。得られた細胞懸濁液を脱イオン水で表面を濡らしたスライドガラスに 1 滴滴下し、よく拡散させて一晩風乾させた。スライドガラスを  $1 \times \text{PB}$  で希釈した  $10 \mu\text{g/mL}$  Hoechst 33258 で遮光しながら  $20 \text{ min}$  染色し、 $1 \times \text{MB}$  でよくすすいだ。乾燥を防ぐため、数滴  $1 \times \text{MB}$  を滴下後、カバーガラスをかぶせ、 $1 \text{ cm}$  の距離からブラックライト ( $352 \text{ nm}$  の紫外線) を  $20 \text{ min}$  照射した。次に、カバーガラスを外し、再び  $1 \times \text{PB}$  でよくすすぎ、3% ギムザ溶液で  $25 \text{ min}$  染色した。MilliQ ですすいだ後、アセトンで 2 回、アセトン：トルエン =  $1 : 1$  で 1 回、トルエンで 2 回すすいだ。乾燥後、カナダバルサムで封入し、後日顕微鏡で観察した。

## 第 13 節 ウェスタンブロッティング

### 13.1 SDS-PAGE

#### 13.1.1 材料および試薬

##### (1) $1 \times \text{Running buffer}$

$3.01 \text{ g}$  の Tris、 $1 \text{ g}$  の SDS、 $14.4 \text{ g}$  の glycine を脱イオン水に溶解し、全量を  $1$

L とした。

(2) 5× Sample buffer

0.25 M Tris-HCl (pH6.8) 、 50 %glycine、 10 %SDS、 0.5 %bromophenol blue、 0.5 M DTT

(3) Precision proein™ Standards Prestained Broad Range (マーカー) (BIORAD)

(4) 泳動用ゲル

	Running gel (12 %)	Stacking gel
29.2%acrylamide-0.8 %bisacrylamide	4 mL	0.65 mL
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	2 .5 mL	-
0.5 M Tris-HCl (pH6.8)	-	1.3 mL
10 % SDS	0.1 mL	0.05 mL
10 % APS	0.1 mL	0.05 mL
MilliQ	1.3 mL	3 mL
TEMED	10 μ L	10 μ L

13.1.2 SDS-PAGE の作成

Running gel、Stacking gel は共に TEMED および APS 以外の試薬を全て混合した後、Running gel に APS、TEMED を加え直にゲル板に流し込んだ。MilliQ を上から少量加えゲル面を平らにした。Running gel の固化後、MilliQ を吸い取り、脱イオン水で洗浄後、Stacking gel に APS、TEMED を加えその上に重層し、コームを挿入して固化させた。

13.1.3 サンプル調製

様々な条件で一定時間培養後、 $5\sim10\times10^5$  細胞をペレットにし、 $20\mu\text{L}$  の 1

×sample buffer を加えよく vortex し、95 °C、10 min 加熱しサンプルとして用いた。

#### 13.1.4 泳動

作成したゲル板にサンプルを 10  $\mu$  L、マーカーを 10  $\mu$  L アプライし、ゲル板 1 枚当たり 20 mA の定電流で泳動した。

### 13.2 ウェスタンブロッティング

#### 13.2.1 材料および試薬

(1) Hybond P 膜 (Amershamacia)

(2) Blotting buffer

80 % 1×Running buffer、20 % MeOH

(3) Blocking buffer

1.5 g の BSA、あるいは skim milk を 30 mL の 0.05 % tween-PBS に溶解し、150  $\mu$  L の 20 % NaN<sub>3</sub> を加えて使用した。

(4) 一次抗体希釈液

0.05% tween-PBS、1 %BSA、0.1%NaN<sub>3</sub>

(5) 二次抗体反応液

10 mL の 0.05% tween-PBS に 0.30 g の BSA を溶解し、5  $\mu$  L の二次抗体を加えて使用した。

#### 13.2.2 実験方法

SDS-PAGE にて分離したタンパク質をウェット方式ブロット装置を用いて Hybond P 膜に 30 V の定電圧で 4 hr から一晩トランスファーした。翌日、membrane

を Blocking buffer に浸し室温で 60 min 震盪した。Tween-PBS で洗浄し 5 min 震盪させることを 3 回繰り返した後、一次抗体を反応させた。同様に Tween-PBS で数回洗浄、震盪を繰り返し、PBS で洗浄後、二次抗体を室温で 60 min 反応させた。再度 Tween-PBS で 3 回洗浄、震盪を繰り返し、PBS で 3 回洗浄、5 min 震盪させた。発色には ECL<sup>TM</sup>Kit を用いてフィルムに検出した。

### 13.2.3 検出に用いた抗体

#### primary Ab

	isotype	dilution	reaction
$\alpha$ lamin B1	mouse IgG <sub>1<math>\kappa</math></sub>	$\times 1000$	r.t. for 1 hr
$\alpha$ phosphorylated Chk1 (Ser345)	rabbit IgG	$\times 1000$	4°C for O/N
$\alpha$ LC-3	rabbit IgG	$\times 2000$	r.t. for 1 hr
$\alpha$ HA	rat IgG	$\times 3000$	r.t. for 1 hr
$\alpha$ $\alpha$ -tubulin	mouse IgG <sub>1</sub>	$\times 10000$	r.t. for 1 hr
$\alpha$ $\beta$ -actin	mouse IgG	$\times 1000$	r.t. for 1 hr

#### Secondary Ab

	dilution	reaction
HRP conjugated $\alpha$ mouse IgG	$\times 2000$	r.t. for 1 hr
HRP conjugated $\alpha$ rabbit IgG	$\times 3000$	r.t. for 1 hr





## 謝辞

本研究にあたり、御指導御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野教授 榎本武美 先生に謹んで御礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、有益なる御助言を頂きました東北大学大学院薬学研究科生体防御薬学分野准教授 久下周佐 先生に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、終始有益な御指導御助言を頂きました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野准教授 関政幸 先生に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多大なる御助言御指導を頂きました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野助手 吉村明 先生に深く心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり、直接御指導いただきました、東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野COE 技術補佐員 井上絵里様に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御指導御助言を頂きました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野助教 多田周右 先生に深く御礼申し上げます。

最後になりましたが、研究生を送るにあたり、常に支えて頂きました細胞チームの皆様、同期の方々を始めとする遺伝子薬学分野の方々に心より御礼申し上げるとともに、今後の御活躍をお祈りします。

高田 隼也

## 引用文献

Avraham, K. B., Schickler, M., Sapoznikov, D., Yarom, R., Groner, Y. (1998) Down's syndrome: abnormal neuromuscular junction in tongue of transgenic mice with elevated levels of human Cu/Zn-superoxide dismutase. *Cell*. **54**, 823-9.

Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B., Rhee, S. G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. **272**, 217-21.

Brar, S. S., Kennedy, T. P., Whorton, A. R., Murphy, T. M., Chitano, P., Hoidal, J. R. (1999) Requirement for reactive oxygen species in serum-induced and platelet-derived growth factor-induced growth of airway smooth muscle. *J Biol Chem*. **274**, 20017-26.

Buerstedde, J. M., Takeda, S. (1991) Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell*. **67**, 179-88.

Carter, C. D., Kitchen, L. E., Au, W. C., Babic, C. M., Basrai, M. A. (2005) Loss of SOD1 and LYS7 sensitizes *Saccharomyces cerevisiae* to hydroxyurea and DNA damage agents and downregulates MEC1 pathway effectors. *Mol Cell Biol*. **25**, 10273-85.

Collins, S., R. Miller, K. M., Maas, N. L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C. S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M., Ding, H., Xu, H., Han, J., Ingvarsdottir, K., Cheng, B., Andrews, B., Boone, C., Berger, S. L., Hieter, P., Zhang, Z., Brown, G. W., Ingles, C. J., Emili, A., Allis, C. D., Toczyski, D. P., Weissman, J. S., Greenblatt, J. F., Krogan, N. J. (2007) Functional dissection of protein complexes

involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* **446**, 806-10.

Das, A., Boldogh, I., Lee, J. W., Harrigan, J. A., Hegde, M. L., Piotrowski, J., de Souza Pinto, N., Ramos, W., Greenberg, M. M., Hazra, T. K., Mitra, S., Bohr, V. A. (2007) The human Werner syndrome protein stimulates repair of oxidative DNA base damage by the DNA glycosylase NEIL1. *J Biol Chem.* **282**, 26591-602.

Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., Sherr, C. J. (1998) Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**, 3499-511.

Eliasson, R., Jornvall, H., Reichard, P. (1986) Superoxide dismutase participates in the enzymatic formation of the tyrosine radical of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**, 2373-7

Folz, R. J., Crapo, J. D. (1994) Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics.* **22**, 162-71.

Fridovich, I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem.* **264**, 7761-4.

Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Kawase, M., Copin, J., Calagui, C., Epstein, C., Chan, P. H. (1999) Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci.* **19**, 3414-22.

Groner, Y., Elroy-Stein, O., Avraham, K. B., Schickler, M., Knobler, H., Minc-Golomb, D., Bar-Peled, O., Yarom, R., Rotshenker, S. (1994) Cell damage by excess CuZnSOD

and Down's syndrome. *Biomed Pharmacother.* **48**, 231-40.

Hiroi, S., Harada, H., Nishi, H., Satoh, M., Nagai, R., Kimura, A. (1999) Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun.* **261**, 332-9.

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A. R., Sassi, H., Nielsen, P. A., Rasmussen, K. J., Andersen, J. R., Johansen, L. E., Hansen, L. H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B. D., Matthiesen, J., Hendrickson, R. C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M. F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C. W., Figeys, D., Tyers, M. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature.* **415**, 180-3.

Huang, M. E., Kolodner, R. D. (2005) A biological network in *Saccharomyces cerevisiae* prevents the deleterious effects of endogenous oxidative DNA damage. *Mol Cell.* **17**, 709-20.

Huang, M. E., Rio, A. G., Nicolas, A., Kolodner, R. D. (2003) A genomewide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 11529-34

Huang, T. T., Carlson, E. J., Kozy, H. M., Mantha, S., Goodman, S. I., Ursell, P. C., Epstein, C. J. (2001) Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med.* **31**, 1101-10.

Huang, T. T., Yasunami, M., Carlson, E. J., Gillespie, A. M., Reaume, A. G., Hoffman, E. K., Chan, P. H., Scott, R. W., Epstein, C. J. (1997) Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* **344**, 424-32.

Junn, E., Lee, K. N., Ju, H. R., Han, S. H., Im, J. Y., Kang, H. S., Lee, T. H., Bae, Y. S., Ha, K. S., Lee, Z. W., Rhee, S. G., Choi, I. (2000) Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF-beta 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca<sup>2+</sup> in TGF-beta 1-induced IL-6 expression. *J Immunol.* **165**, 2190-7.

Karanjawala, Z. E. Hsieh, C. L. Lieber, M. R. Karanjawala, Z. E. Murphy, N. Hinton, D. R. Hsieh, C. L. Lieber, M. R. (2003) Overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase is lethal for mice lacking double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. **2**, 285-94.

Karanjawala, Z. E. Murphy, N. Hinton, D. R. Hsieh, C. L. Lieber, M. R. (2002) Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. *Curr Biol.* **12**, 397-402.

Kong, B. W., Kim, H., Foster, D. N. (2003) Expression analysis and mitochondrial targeting properties of the chicken manganese-containing superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta.* **1625**, 98-108.

Kim, A., Oberley, L. W., Oberley, T. D. (2005) Induction of apoptosis by adenovirus-mediated manganese superoxide dismutase overexpression in SV-40-transformed human fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* **39**, 1128-41.

Lee, J., Romeo, A., Kosman, D. J., (1996) Transcriptional remodeling and G1 arrest in dioxygen stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **271**, 24885-93.

Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., Noble, L. J., Yoshimura, M. P., Berger, C., Chan, P. H., Wallace, D. C., Epstein, C. J. (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* **11**, 376-81.

Liu, J., Narasimhan, P., Lee, Y. S., Song, Y. S., Endo, H., Yu, F., Chan, P. H. (2006) Mild hypoxia promotes survival and proliferation of SOD2-deficient astrocytes via c-Myc activation. *J Neurosci.* **26**, 4329-37.

Menon, S. G., Sarsour, E. H., Kalen, A. L. Venkataraman, S., Hitchler, M. J., Domann, F. E., Oberley, L., W. Goswami, P. C. (2007) Superoxide signaling mediates N-acetyl-L-cysteine-induced G1 arrest: regulatory role of cyclin D1 and manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* **67**, 6392-9.

Mitrunen, K., Sillanpaa, P., Kataja, V., Eskelinen, M., Kosma, V. M., Benhamou, S., Uusitupa, M., Hirvonen, A. (2001) Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis.* **22**, 827-9.

Murata, H., Ihara, Y., Nakamura, H., Yodoi, J., Sumikawa, K., Kondo, T. (2003) Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J Biol Chem.* **278**, 50226-33.

Oberley, T. D., Schultz, J. L., Li, N., Oberley, L. W. (1995) Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radic Biol Med.* **19**, 53-65.

Pan, X., Ye, P., Yuan, D. S., Wang, X., Bader, J. S., Boeke, J. D. (2006) A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* **124**, 1069-81.

Paul, A., Belton, A., Nag, S., Martin, I., Grotewiel, M. S., Duttaroy, A. (2007) Reduced mitochondrial SOD displays mortality characteristics reminiscent of natural aging. *Mech Ageing Dev.* **128**, 706-16.

Peter, Y., Rotman, G., Lotem, J., Elson, A., Shiloh, Y., Groner, Y. (2001) Elevated Cu/Zn-SOD exacerbates radiation sensitivity and hematopoietic abnormalities of Atm-deficient mice. *EMBO J.* **20**, 1538-46.

Ragu, S., Faye, G., Iraqui, I., Masurel-Heneman, A., Kolodner, R. D., Huang, M. E.

(2007) Oxygen metabolism and reactive oxygen species cause chromosomal rearrangements and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 9747-52.

Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X. et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. **362**, 59-62.

Rosenblum, J. S., Gilula, N. B., Lerner, R. A. (1996) On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 4471-3.

Samper, E., Nicholls, D. G., Melov, S. (2003) Mitochondrial oxidative stress causes chromosomal instability of mouse embryonic fibroblasts. *Aging Cell*. **2**, 277-85.

Sarsour, E. H., Agarwal, M., Pandita, T. K., Oberley, L. W., Goswami, P. C. (2005) Manganese superoxide dismutase protects the proliferative capacity of confluent normal human fibroblasts. *J Biol Chem*. **280**, 18033-41.

Smith, S., Hwang, J. Y., Banerjee, S., Majeed, A., Gupta, A., Myung, K. (2004) Mutator genes for suppression of gross chromosomal rearrangements identified by a genome-wide screening in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 9039-44.

Storz, P., Doppler, H., Toker, A. (2005) Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell Biol*. **25**, 8520-30.

Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K., Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. **270**, 296-9.

Tanaka, T., Hosoi, F., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Ueda, S., Nishiyama, A., Takeda, S., Wada, H., Spyrou, G., Yodoi, J. (2002) Thioredoxin-2

(TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO J.* **21**, 1695-703.

Tong, A. H., Evangelista, M., Parsons, A. B., Xu, H., Bader, G. D., Page, N., Robinson, M., Raghbizadeh, S., Hogue, C. W., Bussey, H., Andrews, B., Tyers, M., Boone, C. (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*. **294**, 2364-8.

Wang, D., Masutani, H., Oka, S., Tanaka, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, H., Yodoi, J. (2006) Control of mitochondrial outer membrane permeabilization and Bcl-xL levels by thioredoxin 2 in DT40 cells. *J Biol Chem*, **281**, 7384-91.

Woo, L. L., Futami, K., Shimamoto, A., Furuichi, Y., Frank, K. M. (2006) The Rothmund-Thomson gene product RECQL4 localizes to the nucleolus in response to oxidative stress. *Exp Cell Res*. **312**, 3443-57.

Woodruff, R. C., Phillips, J. P., Hilliker, A. J. (2004) Increased spontaneous DNA damage in Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) deficient *Drosophila*. *Genome*. **47**, 1029-1035.